

Michèle BOURGEAY

Docteur en Médecine

**Contribution à l'étude de l'acétylcholinestérase
en neurologie. Mise au point et utilisation d'une
méthode radioisotopique.**

LYON 1972



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552611_0001

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD

- LYON -

Année 1972 - N° 113

TITRE DE LA THESE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'ACETYLCHOLINESTERASE
EN NEUROLOGIE. MISE AU POINT ET UTILISATION D'UNE
METHODE RADIOISOTOPIQUE

THESE
présentée

à l'Université Claude Bernard-Lyon
et soutenu publiquement le 27 juin 1972
pour obtenir le grade de Docteur en Médecine
par

BOURGEOY Michèle
née le 26 janvier 1942
à LYON 6°

A LA MEMOIRE DE MES GRAND-PARENTS .

A LA MEMOIRE DE MON GRAND-PERE ,

qui n'a jamais cessé de nous donner
l'exemple du travail , du courage et de
l'honnêteté .
Je lui dédie ce travail , faible témoi-
gnage de notre profonde admiration.

A MA GRAND-MERE ,

qui nous donne l'exemple permanent de la
gaieté et de l'entrain . Elle soit l'im-
mense affection que je lui porte .

A MES PARENTS ,

Ils nous ont encouragé tout au long de
nos études . En témoignage de notre af-
fection et de notre reconnaissance ,

A MON FRERE ET MA BELLE-SOEUR ,

EXAMINATEURS DE LA THESE :

En témoignage de mon affection .

-Président : Monsieur le Professeur P.GIRARD

-Assesseurs : Monsieur le Professeur A.BERTOYE

A MA FAMILLE ,

Monsieur le Professeur M.DEVIC

Monsieur le Professeur Cl.QUENCY

A MES AMIS ,

A LA MEMOIRE DE MES GRAND-PARENTS .

A LA MEMOIRE DE MON GRAND-PERE ,

qui n'a jamais cessé de nous donner
l'exemple du travail , du courage et de
l'honnêteté .

Je lui dédie ce travail , faible témoi-
gnage de notre profonde admiration.

A MA GRAND-MERE ,

qui nous donne l'exemple permanent de la
gaieté et de l'entrain . Elle sait l'im-
mense affection que je lui porte .

A MES PARENTS ,

Ils nous ont encouragé tout au long de
nos études . En témoignage de notre af-
fection et de notre reconnaissance .

A MON FRERE ET MA BELLE-SOEUR ,

En témoignage de mon affection .

A MA FAMILLE .

A MES AMIS .

A NOTRE PRESIDENT DE THESE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR GIRARD

Il nous a fait l'honneur d'accepter
la présidence de cette thèse .
Qu'il veuille bien trouver ici le
témoignage de notre profonde admi-
ration et de notre respectueuse
gratitude.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR A. BERTOYE

C'est dans son service que nous avons vécu nos premières gardes. Nous y avons pris conscience de la responsabilité thérapeutique et morale s'attachant à notre profession.

Il nous fait l'honneur de juger ce travail. Nous lui exprimons aujourd'hui notre profonde considération.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR M.DEVIC

La constante bienveillance avec laquelle
il nous a toujours accueilli dans son
service nous a souvent été précieuse.

Nous avons eu l'honneur d'apprécier, au-delà
sa profonde connaissance de la neurologie,
son respect du malade, son humour et sa
courtoisie.

Nous le remercions pour la confiance qu'il
nous a faite en acceptant de nous guider
dans ce travail. Nous lui exprimons ici,
toute notre gratitude.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR C1.QUINCY

C'est toujours avec une égale gentillesse qu'il nous a aidé à résoudre les problèmes multiples que nous avons rencontrés au cours de la lente élaboration de notre méthode. Il nous a procuré avec constance les L.C.R. nécessaires à ce travail.

Nous lui exprimons ici, notre plus vive reconnaissance.

A MADEMOISELLE LE DOCTEUR F.N. GUILLERMET

La grande indulgence dont elle a souvent fait preuve à notre égard, nous a permis de mener à bien ce long travail.

C'est à elle que nous devons, par son enseignement de chaque jour, dans les traditions pasteuriennes, notre formation bactériologique et notre intérêt pour les germes anaérobies. Nous avons pu ainsi apprécier ses vastes connaissances et sa grande culture.

Nous l'assurons ici, de toute notre sympathie.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR M.JOUVET

Il nous a accueilli avec bienveillance dans son unité de recherche. Les conseils et l'enseignement de son équipe nous furent d'un grand secours.

Nous l'en remercions vivement ainsi que tous ses collaborateurs.

A MONSIEUR LE DOCTEUR O.JOYEUX

Sa profonde culture et sa grande expérience nous ont été précieuses.

A MONSIEUR G.CAUSSE

Son esprit critique a donné à notre pensée sa forme définitive.Nous l'assurons ici, de toute notre amitié.

Nous remercions : Le Professeur ALLEGRE

Le Professeur SCHOTT

Le Professeur LECUIRE

Le Professeur MANSUY

d'avoir bien voulu mettre à notre disposition les dossiers de leurs services.

INTRODUCTION

L'existence d'une enzyme responsable de la destruction de l'acétylcholine a été suggérée par Dales dès 1914 .Ce n'est qu'en 1932 que Stedman et coll. -197- ont observé sa présence. L'enzyme capable de scinder l'acétylcholine fut alors nommée "cholinestérase".

Plus tard, les auteurs furent amenés à distinguer deux types de cholinestérase pouvant être définis par la spécificité de leur substrat,leur sensibilité à différents inhibiteurs,leurs constantes de Michaelis et enfin,le matériel biologique dont elles sont issues.-Giacobini (1959) -073-.

-- L'acétylcholinestérase ($EC_{3.1.1.7}$ selon la terminologie internationale,cholinestérase spécifique,cholinestérase vraie,cholinestérase de type "e",cholinestérase type I.) capable de scinder l'ester acétique de la choline .

-- Les pseudocholinestérases ($EC_{3.1.1.8}$ selon la terminologie internationale,cholinestérase non spécifique,cholinestérase de type "s",cholinestérase de type II.)capables d'hydrolyser d'autres esters:butyrylcholine,benzoylcholine,succinylcholine.

L'acétylcholinestérase est présente dans le tissu nerveux de l'ensemble du règne animal. La localisation de cette enzyme sur les membranes excitables,bien que postulée depuis une vingtaine d'années en raison d'évidences biochimiques indirectes,n'a été démontrée que récemment par les techniques histochimiques, puis par la microscopie électronique.-Brzin (1966) -033- Schaelfer et Torack (1965) -191- .

A partir d'un grand nombre d'observations,Nachmansohn (1959) -156-, (1966) -158-, (1968) -159-pensa que l'acétylcholine intervenait dans la génération de l'influx. L'acétylcholine joue, au niveau des membranes excitables, le rôle d'un

signal spécifique et entraîne la modification conformationnelle d'une protéine acétylcholino-réceptrice localisée sur ces membranes. Ce changement provoque une série de réactions dont résulte une augmentation de la perméabilité ionique au cours de laquelle 20 000 ou 40 000 ions traversent la membrane pour chaque molécule d'acétylcholine mise en oeuvre. L'hydrolyse de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase restaure la barrière ionique.

Selon Nachmansohn (1963) -157-, les protéines qui sont directement associées à la fonction et au métabolisme de l'acétylcholine ont, par conséquent, un rôle fondamental dans l'activité nerveuse. Au premier rang de ces protéines se trouve l'acétylcholinestérase. Les travaux consacrés à cet ensemble métabolique et en particulier à l'acétylcholinestérase sont nombreux. -Leuzinger et coll. (1969) -134-

Les études à visée clinique dans le liquide céphalo rachidien sont, par contre, rares et les contradictions y sont fréquentes. Quelques auteurs ont tenté d'établir des corrélations entre le taux d'acétylcholinestérase présente dans les liquides biologiques utilisables en pratique clinique. Une telle entreprise s'est, en ce qui concerne le liquide céphalo rachidien, heurtée à un écueil considérable : le faible taux d'acétylcholinestérase présente dans le liquide céphalo-rachidien est du même ordre de grandeur que l'erreur liée aux méthodes utilisées.

Dans ce travail, nous nous proposons, tout d'abord, de faire un bref rappel des notions fondamentales concernant l'enzyme ; puis nous aborderons les diverses techniques qui furent utilisées et les raisons pour lesquelles nous les estimons insuffisantes. Nous terminerons cette première partie

en exposant notre méthode et en la comparant avec les méthodes les plus usitées.

Dans un second temps nous appliquerons cette méthode au dosage de l'activité acétylcholinestérasique de liquides céphalo-rachidiens pathologiques. Les résultats de la littérature étant contradictoires, cette étude nous permettra d'une part de considérer un taux comme normal, et d'autre part de voir quelles sont les affections qui apparaissent comme modifiant ce taux de base. Nous remarquerons le cas particulier que constitue l'ensemble des malades atteints de maladie de Parkinson. Cependant, nous devons noter dès maintenant qu'il n'existe aucune trace de telles constatations dans la littérature, ni aucun travail portant sur ce sujet. La thérapeutique pouvant intervenir dans les taux observés, nous essayerons de retrouver les faits cliniques par une expérimentation chez le rat.

Dans notre conclusion, nous ne tenterons pas de répondre aux nombreuses questions que soulève cette enzyme. Nous nous bornerons à l'interprétation des résultats.

ACh	-----	Acétylcholine
AChE	-----	Acétylcholinestérase
BuChE	-----	Butyrylcholinestérase
C.S.F.	-----	Cerebrospinal fluid
dpm	-----	Désintégration par minute
L.C.R.	-----	Liquide céphalo-rachidien
S.E.P.	-----	Sclérose en plaques
S.L.A.	-----	Sclérose latérale amyotrophique
S.N.C.	-----	Système nerveux central

I . L' E N Z Y M E :

I . 1 . L'ACETYLCHOLINESTERASE NATIVE

I . 2 . LES ISOENZYMES

I . 3 . L'ENZYME IN SITU :

I . 3 . 1 . L'AcHe dans le S.N.C.

I . 3 . 2 . L'AcHe dans la cellule

I . 3 . 3 . L'AcHe dans le L.C.R.

I . L' E N Z Y M E :

I . 1 . L'ACETYLCHOLINESTERASE NATIVE

L'AChE qui hydrolyse l'ACh en quelques instants selon la réaction :



est rencontrée à une concentration très élevée au niveau des organes électriques de certains poissons comme l'Electrophorus electricus et le Torpedo marmorata. Ainsi, bien que constitué de 3 % de protéine et de 92 % d'eau, 1 Kg de tissu électrique de gymnote est capable d'hydrolyser en une heure, 3 à 4 Kg d'ACh.-Leuzinger (1969) -131-.

Cette haute teneur en enzyme a permis dès 1940 l'obtention de préparations partiellement purifiées par Rothenberg et Nachmansohn (1947) -187-. Les études cinétiques, faites alors, donnèrent des informations sur les sites actifs.

L'enzyme hautement purifiée et cristallisée qui fut obtenue par Leuzinger, Baker et Cauvin (1968) -133- a rendu possible l'étude approfondie des propriétés enzymatiques. Leuzinger (1969) -131-, Leuzinger et coll. (1969) -134-.

Les cristaux sont très bien formés. Ils appartiennent le plus souvent au système prismatique. Les cristaux ayant une réfringence faible, il n'est actuellement pas possible de savoir s'ils sont uni ou bi-axiaux. L'analyse des acides aminés n'a révélé aucune constitution particulière, si ce n'est la présence de glucosamine, de galactosamine et sans doute de talosamine.

Le poids moléculaire de l'enzyme native a été déterminé par centrifugation isopicnique, à l'équilibre, méthode connue pour la précision de ses résultats. Leuzinger, Goldberg et Cauvin (1969) -134- trouvent 260 000 . Ce résultat est proche de ceux donnés par Lawler (1961) -129-, puis par Leuzinger et Baker (1967) -132- qui étaient respectivement de 240 000 et 250 000.

La valeur élevée de ce poids moléculaire indique que l'ACHé comporte plusieurs chaînes polypeptidiques. Les études portant sur ce sujet n'ont actuellement débouché sur aucune conclusion définitive. Certains auteurs ont cherché à dissocier les différentes chaînes. Ceci a été obtenu par centrifugation de l'enzyme native en solution dans le mercapto-éthanol (0,02 M)-chlorhydrate de guanidine (6 M) par Ullmann (1968) -215-. Dans ces conditions, les sous-unités protéiques semblent homogènes et le poids moléculaire est environ égal au quart de celui de l'enzyme native. Par contre les travaux de Leuzinger (1969) -131- l'amènent à considérer la molécule d'ACHé native comme constituée de quatre sous-unités dont le poids moléculaire est de $64\ 000 \pm 4\ 000$, et qui seraient de deux types : les chaînes α et les chaînes β .

Plus récemment Millar et Grafius (1970) -155- ont confirmé le poids moléculaire de l'enzyme native avec un chiffre de 259 000 . Cependant, bien qu'étant dans les mêmes conditions expérimentales que Leuzinger (1969)-131-, ils obtiennent pour le poids moléculaire de la sous-unité une valeur de l'ordre de 21 500. Il est à noter que cette valeur est compatible avec l'estimation du poids moléculaire déduit de l'analyse séquentielle. On peut donc penser que l'unité structurale dont le poids moléculaire est de 42 000 serait

constituée de deux éléments. La molécule regroupant alors six sous-unités structurales.

Leuzinger (1969) -131- par trois méthodes différentes montre que l'ACHé possède seulement deux sites actifs. La chaîne α pourrait être considérée comme portant le ou les sites actifs alors que la fonction de la chaîne β reste actuellement indéterminée. L'hypothèse selon laquelle l'activité du site nécessiterait la présence des deux chaînes entraînant pour la chaîne β un rôle dans la fixation de l'ACh ne peut être écartée.

Un certain nombre de travaux donnent des résultats quelque peu différents. Kremzner et Wilson (1964) -122- ont mis en évidence quatre sites actifs au niveau de l'enzyme native (P.M.:230 000). En 1954 Michel et Krop -154- avaient objectivé six sites actifs par molécule d'ACHé de poids moléculaire 260 000. Les résultats de Millar et Grafius (1970) -155- font intervenir six sous-unités qui pourraient correspondre à six sites actifs. Ces différents résultats suggèrent à Widlund et Chamberlin (1970) - 225- que tous les sites ne sont pas équivalents. Cependant si, le nombre de sites actifs est effectivement moindre que le nombre de sous-unités par molécule d'enzyme, on peut penser que certaines chaînes polypeptidiques préformées jouent un rôle autre que celui d'hydrolyse par l'ACh. L'intervention directe au niveau de la membrane et de sa perméabilité n'est pas exclue. Millar et Grafius (1970) -155-.

Quoiqu'il en soit, un site actif est constitué d'un site anionique dit de fixation qui entre en contact avec l'ammonium quaternaire et un site cationique dit estérasique qui fixe le radical acétyl. Ce site estérasique est peut-être

constitué de plusieurs pôles basiques. La fixation se ferait sous l'influence des forces de Van der Waals. La choline est libérée alors que la libération de l'acétate n'est pas immédiate.

Les premiers essais d'estimation du "turn over time" remontent à 1947 avec Rothemberg et Nachmansohn -187-. Puis Michel et Krop (1951) -154- abordent cette étude en utilisant de l'ACHé de gymnote. L'activité spécifique de ces préparations étant faible, aucun résultat n'est significatif. Ce n'est qu'en 1959 que Lawler (1961)-129- reprend le problème avec une enzyme hautement purifiée extraite d'*Electrophorus electricus*, et obtient une valeur de 100 n.Secondes. Cet auteur convient cependant que ses conditions expérimentales ne permettent pas l'obtention d'un chiffre exact. Cette estimation du "turn over time" est à considérer avec une grande réserve car ce n'est que près de 10 ans plus tard que l'enzyme est cristallisée par Leuzinger, Baker et Cauvin (1968) -133-.

L'étude des constantes de Michaelis apporte plus de rigueur. Alors qu'en 1950 les premières évaluations donnaient un ordre de grandeur de 3.10^{-3} M.L⁻¹, Koelle (1950) -105-, les travaux récents aboutissent à un Km de l'acétylcholinestérase native vis à vis de l'acétylcholine de l'ordre de 2.10^{-4} M.L⁻¹

La présence des deux types de site et les courbes cinétiques ont permis d'expliquer l'action des inhibiteurs.

--- Un excès de substrat peut inhiber l'enzyme par fixation sur le site anionique.

--- Le DFP (di-isopropylfluorophosphate) se fixe sur le site estérasique. Cette fixation est très stable. Le DFP agit comme un inhibiteur irréversible.

--- La néostigmine représente le dernier type d'inhibiteur car elle agit sur les deux sites à la fois. Sa vitesse d'hydrolyse est 10^6 fois plus faible que celle de l'ACh. Avec le temps elle se comporte comme un inhibiteur réversible.

Les travaux portant sur ces différents inhibiteurs étant classiques, nous ne citons ces mécanismes que pour mémoire.

--*--
*

I . 2 . LES ISOENZYMES DE L'ACHÉ

Dès l'étude de l'enzyme native, un certain nombre de points restent obscurs. La présence d'isoenzymes n'a pas simplifié le problème. Les travaux portant sur l'ACHé du tissu nerveux ont objectivé en électrophorèse trois enzymes différentes. Malheureusement, deux des bandes obtenues par Bernsohn et coll. (1963) -O24- sont très proches l'une de l'autre. Elles sont donc étudiées ensemble. Ces auteurs qui trouvent un K_m de $2,2 \cdot 10^{-4} \text{ M.L}^{-1}$ pour l'enzyme native, obtiennent pour les isoenzymes des K_m de 1,5 et $1,3 \cdot 10^{-4} \text{ M.L}^{-1}$. Ces valeurs sont confirmées par Patocka (1969) -169-.

L'ultracentrifugation en gradient de saccharose permet à Massoulié, Rieger et Bon (1970) -147- d'isoler trois isoenzymes à partir d'ACHé d'*Electrophorus electricus*. Pour ces variétés qu'ils nomment A, C, et D, ils obtiennent respectivement des constantes de sédimentation de 8,5 - 14,2 - et 18,4 S. L'ACHé cristallisée par Leuzinger et Baker (1968) -133- en diffère avec une constante de sédimentation de 11,8 S. Les auteurs lui donnent le nom de variété B. Toutes ces isoenzymes sont des protéines stables et l'action de la trypsine sur chaque variété aboutit à la création d'un composé dont la constante de sédimentation, bien qu'étant significativement différente de celle de l'ACHé purifiée, s'en rapproche. Massoulié, Rieger et Bon (1970) -147-, bien que B soit supérieur à A concluent à la possibilité d'une conversion en cascade selon: $D \rightarrow C \rightarrow A \rightarrow B$ et pensent que l'hypothèse la plus probable pour expliquer ce fait est la rupture plus ou moins importante de l'édifice membranaire lors de la préparation. L'existence distincte des différentes isoenzymes in

situ est cependant une hypothèse qui ne peut actuellement être infirmée.

Davis et Agranoff (1968) -049- ont étudié le turn over des isoenzymes de l'AChE qu'ils séparent par électrophorèse en gel de polyacrylamide. Utilisant in vivo l'inhibition par le DFP pour observer la rapidité de réapparition de l'activité enzymatique, d'une part, d'autre part, le blocage des synthèses protéiques par l'acétoxycycloheximide pour observer la diminution d'activité en fonction du temps. Ces auteurs ont mis en évidence qu'une des isoenzymes de l'AChE présentait une demi-vie exceptionnellement courte : de l'ordre de trois heures. La cinétique du métabolisme de cet isoenzyme semble être d'ordre zero pour la synthèse et d'ordre un pour la dégradation. Davis et Agranoff soulignent que ce composant à turn over rapide ne représente qu'un pourcentage faible de l'AChE totale ; sa signification reste incertaine bien qu'un rôle de précurseur des autres enzymes puisse être évoqué.

--*--
*

I . 3 . L'ACETYLCHOLINESTERASE IN SITU :

I . 3 . 1 . L'AcChE dans le S.N.C.

Dès 1945 Nachmansohn et Rothenberg -160- constatent une activité acétylcholinestérasique importante au niveau du noyau caudé et du noyau lenticulaire alors que le cortex humain montrait une faible activité. Ces faits furent confirmés par de nombreux travaux.

Foldes et coll. (1962) -063- utilisèrent simultanément l'histologie, avec la technique de Koelle (1950) -105- et la détermination manométrique selon la méthode d'Ammon (1934) -004-. Les résultats furent similaires par les deux méthodes: aucune différence significative n'apparaît au niveau des aires corticales.

Les taux d'activité sont croissants si l'on considère: les aires corticales, le cortex cérébelleux, le thalamus, le globus pallidus, et enfin le noyau caudé. Foldes et coll. (1962) -063-

Récemment Bajgar et Urban (1970) -012- ont mesuré l'activité enzymatique par la méthode d'Ellman et coll. (1961) -061- chez le rat. La plus haute activité est également observée au niveau du ganglion basal et du tuberculus olfactorius.

En fait le système cholinergique reste un des plus mal connu sur le plan physiologique. Il est cependant indiscutable qu'il existe des relations entre le noyau caudé et les autres régions du cerveau. Les travaux de Shute et Lewis (1967) -196- ont permis aux auteurs de réaliser une carte montrant assez clairement cet ensemble. (cf. fig n°1).



figure n° 1

1-colliculus ; 2-noyau centro-médian ; 3-noyau oculo-moteur ; 4-noyau cunéiforme ; 5-thalamus ; 6-globus pallidus ; 7-noyau caudé ; 8-tuberculus olfactorius ; 9-substantia nigra ; 10-hypothalamus ; 11-aire pré-optique ; 12-ventral tegmental area ; 13-corps mamillaire. Selon Shute et Lewis :cerveau de rat.

En outre, les expériences de Poirier(1965)-178- mettent en évidence une boucle entre différents systèmes : la destruction du noyau centro-médian du thalamus n'entraîne pas de diminution de dopamine dans le noyau caudé, mais une baisse significative en cholinestérase.

I . 3 . 2 . L'ACHE DANS LA CELLULE

La localisation de l'AcHe au niveau subcellulaire est relativement bien connue bien que là encore, se pose un certain nombre de problèmes. Il nous a semblé utile dans ce domaine de considérer les faits sous deux angles différents:

tout d'abord la situation de l'AChE à l'intérieur même du neurone et par voie de conséquence les hypothèses concernant sa synthèse. Ensuite, nous aborderons sa localisation au niveau de la synapse et par là nous serons conduit à évoquer le problème du récepteur de l'acétylcholine.

Le cas particulier de la localisation de l'AChE au niveau du L.C.R. ne sera qu'alors abordé .

L'étude de la localisation subcellulaire commence avec l'apparition de l'ultra-centrifugation. Nathan et Aprison (1955) -162- montrèrent que les particules cytoplasmiques et les mitochondries du noyau caudé de lapin contenaient 70 % de l'activité de l'enzyme. Toschi (1959) -206- ainsi qu'Aldridge et Johnson (1959) -003- ont établi que la plus grande partie d'AChE contenue dans les particules cytoplasmiques était située au niveau des microsomes.

Toschi (1959) -206- postula alors que l'activité était liée à des membranes dénuées de ribosomes qui provenaient sans doute du reticulum endoplasmique. Ces résultats sont retrouvés par Giacobini (1959) -073- et par De Robertis et coll. (1962) -053-. Ce dernier utilise l'ultracentrifugation différentielle en gradient de saccharose. Cette méthode lui permet de constater que près de 60 % de l'enzyme est située dans la portion mitochondriale et le subfractionnement met en évidence au niveau des bandes correspondant à 1 et 1,2 M de saccharose une grande activité.

Fukuda et Koelle (1959) -068- à partir d'investigations en microscopie optique pensent que la cholinestérase est synthétisée au niveau du corps cellulaire puis transportée au niveau des terminaisons nerveuses. Les travaux de Kasa

et Csillik (1966) -098- ainsi que ceux de Kaye et Pappas (1965) -101- montrent la présence d'AChE sur la surface externe des membranes. La question qui se pose est donc double. Elle concerne non seulement la synthèse de la protéine mais aussi la traversée de la membrane cytoplasmique.

Kasa (1968) -097- par ses investigations en microscopie électronique montre que l'AChE et probablement d'autres protéines sont fabriquées, au moins en partie, au niveau du péricaryon puis transportées vers les extrémités nerveuses où elle devient fonctionnelle. Dans ce transport le système de Golgi et les tubules, aussi bien que le matériel axoplasmique peuvent jouer un grand rôle. Lubinska et coll. (1964) -137-. Les protéines transportées par le système tubulaire sont acheminées rapidement alors que celles qui sont incorporées à l'axoplasme le sont plus lentement.

Si les travaux de Kasa (1968) -097- suggèrent que l'AChE transportée par les tubules est synthétisée au niveau du péricaryon, cependant, après une inactivation irréversible de l'enzyme par le DFP, Koenig (1965) -118- trouve que le taux d'enzyme restauré est le même dans la portion distale du nerf étudié que dans la portion proximale. Il semble donc plausible de conclure que l'AChE suit la règle générale des synthèses protéiques au niveau des tissus nerveux.

Koenig (1965) -118- discuta le problème de la synthèse locale axonale. Finalement, il opta pour un double mécanisme de synthèse : d'une part une synthèse complète suivie de migration, d'autre part, une synthèse partielle locale à partir des sous-unités ou de formes inactivées.

En ce qui concerne la mise en évidence d'AChE au

niveau de la face externe des membranes, de nombreux travaux en font état. Salpeter (1968) -189-, Koelle (1968) -110-, Barnard et coll. (1968) -014-. Le problème du passage de l'enzyme à travers la membrane reste cependant un problème non résolu et aucun travail ne nous a semblé être susceptible d'être retenu. Par contre, de très nombreux auteurs se sont intéressés au rapport qui existe entre l'enzyme fixée au niveau de la membrane distale de la synapse et la protéine cholino-réceptrice qui va capter l'ACh libérée pour permettre son hydrolyse.

La notion qui implique l'ACHÉ dans le mécanisme des récepteurs cholinergiques étant acquise depuis longtemps l'étude de l'action de cette enzyme est un des modes d'approche fondamentaux, parallèlement à l'étude des relations structure-activité d'agents pharmacodynamiques, pour définir un modèle de récepteur.

Comme le précise Ehrenpreis et coll. (1970) -059-, il y a trois aspects primordiaux de la théorie des récepteurs qu'un tel modèle doit essayer d'expliquer :

--- Il doit renseigner sur la façon dont le site récepteur distingue un agent antagoniste d'un agent mimétique d'après leur structure.

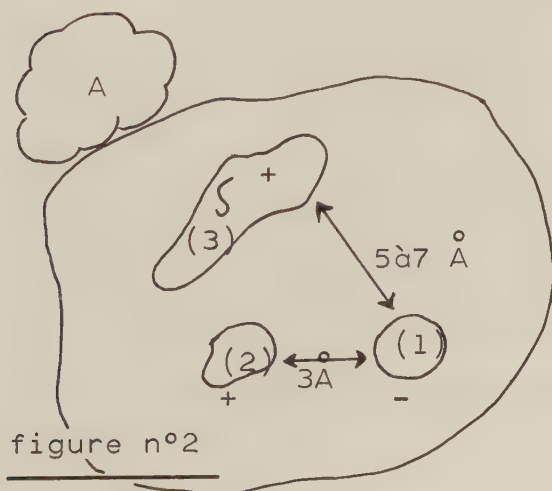
--- Il doit expliquer comment cette interaction est ensuite transformée en un effet physiologique tel qu'une dépolarisation.

--- Il doit aussi montrer comment au niveau moléculaire certaines structures vont permettre ou au contraire bloquer ce phénomène.

Or jusqu'à présent, les travaux tendant à établir un modèle de récepteur, dont nous ne citerons que les prin-

cipaux, répondent plus ou moins partiellement à certains critères, mais dans chaque cas, il y a toujours des actions pharmacodynamiques qui restent inexpliquées. Ceci est, en bonne partie, due au fait que rares sont les substances dont on est sûr que leur action ne s'exerce qu'exclusivement sur le récepteur source de la réponse.

Il faut citer tout d'abord une série de travaux importants qui, ayant porté sur la liaison entre la structure stéréochimique et l'activité muscarinique d'un certain nombre de substances, permirent ultérieurement l'établissement d'un modèle de récepteur muscarinique. Ehrenpreiss (1969) -059- Ce sont essentiellement les travaux de Waser (1961) -218- avec la muscarine, de Belleau (1963) -019- avec le 1-3 dioxolane, de Beckett et coll. (1963) -018- avec les isomères de l'acétyl méthylcholine et de l'acétyl méthylcholine. L'activité des composés se révélant indépendante des fonctions esters, hydroxyl ou cétone de ces composés mais liée à leur configuration stérique et électronique, Beckett put en 1967 proposer un schéma de structure de récepteur muscarinique basé sur la densité électronique en accord avec la configuration la plus vraisemblable de l'acétylcholine déduite d'études cristallographiques et de calculs théoriques. (cf fig n°2)



Ce schéma fait intervenir un site anionique (1), chargé négativement, apte à fixer l'azote quaternaire, un groupe-ment (2) chargé positivement correspondant à la fonction ester de l'acétylcholine ou ether de la muscarine, un site (3) chargé positivement adapté

à l'hydroxyl de la muscarine ou à l'acétyl de l'acétylcholine, enfin une région A dite "accessory binding" suggérée par Ellenbroek.-059-.

Ehrenpreiss (1969) émet l'hypothèse que le site estérasique de l'AChE pourrait être incorporé dans le récepteur, l'ensemble du système étant situé dans la membrane. A ce stade selon l'auteur, l'enzyme ne manifesterait pas son activité hydrolytique jusqu'à ce que la structure acétyl du substrat vienne se fixer sélectivement.

Par contre, Zupancic dès 1964 -232- prenait comme hypothèse de travail : le récepteur serait le site anionique de l'AChE, le site estérasique n'ayant qu'un rôle indirect.

Des travaux ultérieurs de Zupancic (1970) -235- réalisés avec des membranes et non plus avec l'enzyme purifiée confirmeraient cette hypothèse. Selon cet auteur, il est concevable que la modification conformationnelle au niveau de la structure quaternaire de l'enzyme réceptrice ne serait qu'un exemple de l'extension de la notion de récepteur.

I . 3 . 3 . L'AChE dans le L.C.R.

Plattner et Hinter détectèrent dès 1930, en utilisant une méthode biologique, la présence au niveau du L.C.R. d'un facteur attaquant l'ACh. Plus tard, Birhäuser (1941)-027- dosa l'activité acétylcholinestérasique du L.C.R. à l'aide de la méthode manométrique d'Ammon. Ces premières investigations permirent de constater que le taux d'activité était deux cent fois inférieur au taux d'activité trouvé dans le sang total.

Dès ces premiers résultats, les auteurs s'interro-

gèrent pour savoir quelle était la provenance de l'enzyme qui existait au niveau du L.C.R. . En effet, d'une part le L.C.R. est en contact avec le sang par l'intermédiaire de la barrière hémoméningée; (Il est cependant à noter qu'au niveau du sang, la grande majorité de la cholinestérase vraie est adsorbée au niveau de la membrane des hématies, alors que la pseudocholinestérase constitue la plus grande partie de l'enzyme sérique.) D'autre part, le L.C.R. baigne directement les tissus nerveux et des structures telles que le noyau caudé sont d'une extrême richesse puisqu'un gramme de tissu frais est capable d'hydrolyser en une heure 1500 μ M d'ACh. C'est à dire que 100 ml de L.C.R. contiendraient environ la quantité d'enzyme retrouvée dans 50 mg de noyau caudé.

Etant données ces constatations, il est donc possible que l'AChE du L.C.R. provienne de l'un ou de l'autre, ou des deux à la fois . Un certain nombre d'expériences, sans apporter de preuve formelle semblent tout de même permettre de pencher pour une origine encéphalique de l'enzyme.

Tout d'abord, quelques travaux font supposer que les modifications de l'AChE sanguine n'entraînent pas de modification au niveau des différentes structures encéphaliques. Nous ne citerons dans ce groupe que les travaux d'Aarseth et Barstad (1968) -001- qui inhibèrent l'AChE sanguine par injection sous-cutanée d'inhibiteur irréversible. Dans les conditions expérimentales, aucune modification n'est décelée au niveau des structures encéphaliques. Cette étude doit cependant être considérée avec prudence car Davis et Aggranoff (1968) -049- en injectant par voie intra-musculaire du DFP à raison de 2mg par Kg chez des rats, ont obtenu une inhibition de l'AChE au niveau de l'encéphale comme au niveau de la rétine

et du muscle. Nous pensons que les divergences de résultats dépendent des différences de comportement des quantités d'inhibiteurs utilisés vis à vis de la barrière hémoméningée. En effet, si les conditions expérimentales permettent l'intrusion dans le tissu cérébral du DFP, il est bien évident que l'AChE sera inhibée.

Les travaux d'Aarseth et Barstad (1968) -001- qui font supposer une certaine indépendance entre l'AChE encéphalique et sanguine sont renforcés par les observations de Svensmark (1961) -201- qui a traité par deux méthodes de séparation trois types d'échantillons : serum, L.C.R. et broyat de tissu nerveux. (cf. fig. n°3) Cette étude aboutit aux conclusions

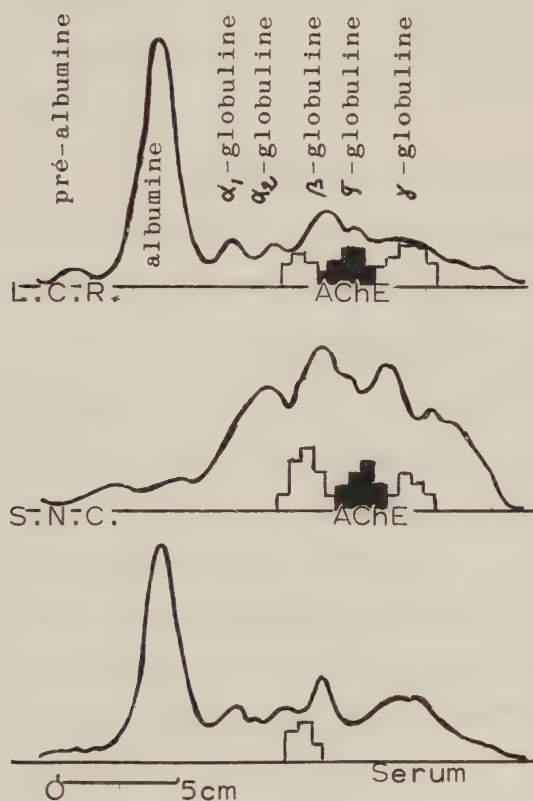


figure n°3

suivantes : il existe une seule BuChE au niveau du sérum et deux au niveau de l'encéphale et du L.C.R.. Il n'est d'ailleurs pas exclu que ces deux enzymes ne représentent en fait qu'une seule enzyme. En effet, il est possible de passer de l'une à l'autre sous l'action d'une sialidase: enzyme qui est présente dans la L.C.R.. Par ces méthodes, l'AChE n'est retrouvée qu'au niveau du broyat nerveux et du L.C.R., elle migre dans ces deux cas de la même façon et se situe entre les deux BuChE, c'est à dire entre les β et les γ -globulines.

Ces faits qui sont en faveur d'une origine encéphalique de l'ACHé du L.C.R. n'apportent aucune preuve en ce qui concerne la possibilité de migration de l'enzyme au niveau des espaces inter-cellulaires du tissu nerveux.

Nous rapporterons quelques travaux, qui bien que portant sur des observations différentes rendent l'hypothèse d'un passage de l'enzyme à travers les espaces inter-cellulaires vers le L.C.R. vraisemblable. Ce sont tout d'abord, les travaux d'Hochwald (1967-1969) -082-083- qui ont mis en évidence un passage lent d'albumine et de protéine marquée introduite au niveau du torrent circulatoire, jusque dans le L.C.R. Ces protéines, selon Hochwald, emprunte deux voies : soit directement à travers les plexus choroïdes, soit indirectement en empruntant l'espace extra-cellulaire du système nerveux central.

Brightman (1965) -032- a également mis en évidence une libre circulation de grosses molécules : la ferritine, dans les espaces inter-cellulaires.

Plus récemment Cutler et coll. (1970) -048- ont montré que de la lysine et de la glycine radio-active introduites par voie intra-ventriculaire dans des cerveaux de chat diffusaient dans les espaces inter-cellulaires contigus. Cependant ces substances étant d'un poids moléculaire relativement faible, nous pensons que cette expérimentation n'est valable qu'appuyée par les travaux précédemment exposés. Elle prouve en fait qu'il existe un échange réciproque entre le L.C.R. et le S.N.C. .

Il est certes difficile à partir de ces notions de conclure fermement au sujet de l'origine de l'ACHé trouvée

au niveau du L.C.R.. Il ne nous semble cependant pas illogique de penser que l'enzyme fixée sur la membrane synaptique, lors de remaniement est éliminée dans la L.C.R. par l'intermédiaire des espaces extra-cellulaires. On sait qu'une grande partie de cette enzyme est dégradée, mais les quantités trouvées au niveau du L.C.R. étant infimes par rapport aux quantités qui existent dans les tissus, les deux faits ne semblent pas contradictoires.

--*--
*--

II . L E S M E T H O D E S :

II . 1 . L E S M E T H O D E S A N T E R I E U R E S :

II . 1 . 1 . L e s m é t h o d e s m a n o m é t r i q u e s

II . 1 . 2 . L e s m é t h o d e s s p e c t r o p h o t o m é t r i q u e s

II . 1 . 3 . L e s m é t h o d e s r a d i o i s o t o p i q u e s

II . 2 . N O T R E M E T H O D E :

II . 2 . 1 . L e p r i n c i p e

II . 2 . 2 . L e m a t é r i e l

II . 2 . 3 . L e p r o t o c o l e

II . 2 . 4 . J u s t i f i c a t i o n d e l a m é t h o d e

II . 3 . D I S C U S S I O N

II . L E S M E T H O D E S :

II . 1 . L E S M E T H O D E S A N T E R I E U R E S :

Ce chapitre sera consacré à différents types de méthodes utilisées pour doser l'AChE au niveau du S.N.C. . Il n'est pas concevable, de faire, ici, l'analyse de toutes les méthodes, ni même de les citer toutes. Nous nous attachons à décrire la méthode originale ou, lorsqu'un grand nombre existe dans la série, celle qui a le plus largement été utilisée dans la littérature.

Les procédés histologiques, bien qu'ils présentent un grand intérêt: ils ont permis d'avoir les premières dispositions anatomiques, sont éloignés de notre propos. Ces techniques sont très certainement dominées par les travaux de l'école de Koelle. Cette équipe a fourni depuis une vingtaine d'année non seulement la plupart des méthodes de microscopie optique mais effectué de nombreux travaux en microscopie électronique. Koelle (1950 à 1970) -105- à -117-.

II . 1 . 1 . L E S M E T H O D E S M A N O M E T R I Q U E S :

Les travaux et l'appareil de Warburg ont permis à Ammon (1933) -004- d'effectuer les premiers dosages d'enzyme hydrolysant l'acétylcholine en mesurant manométriquement la quantité de CO_2 dégagé par unité de temps, libéré par l'acide acétique provenant de l'hydrolyse de l'ester.

Cette méthode a apporté beaucoup puisque pendant vingt ans, elle fut la seule. Certes, de nombreux auteurs

(Giacobini (1959) -073-, Bonting et Featherstone (1956) -031-) apportèrent des modifications en utilisant différents substrats ou en faisant intervenir des inhibiteurs sélectifs des différents enzymes susceptibles d'attaquer à plus ou moins long terme les esters de la choline. En fait, toutes les méthodes manométriques de ces auteurs n'ont fait que compléter par souvent fort peu de chose la méthode d'Ammon. Nous n'en décrivons donc aucune, en soulignant cependant que la méthode dite d'Hestrin (1949) -081- est souvent rapportée par les auteurs.

Les dosages effectués sur le L.C.R. donnent un taux de 100 $\mu\text{M}/100\text{ml}/\text{h}$ selon Glasson et Mutrux (1946) -076-. Ces chiffres sont assez proches de ceux considérés aujourd'hui comme fréquents.

En ce qui concerne le dosage de l'ACHÉ au niveau du tissu nerveux, une importante étude a été faite par Foldes et coll. (1962) -063- avec cette méthode et les taux enzymatiques correspondent à ceux que nous trouvons. Cette étude a été menée sur des cerveaux humains. Le noyau caudé humain développe une activité du même ordre que celui de rat, soit un taux de l'ordre de 1400 $\mu\text{M}/\text{h}/\text{g}$ de tissu.

La précision de cette méthode est malheureusement desservie par un certain nombre d'inconvénients. L'appareil de Warburg, pour donner de bons résultats doit être manipulé avec grand soin et le seul fait de changer de manipulateur peut entraîner des modifications significatives. Si l'on veut avoir une précision suffisante, les quantités de CO_2 obtenues doivent être produites par des quantités relativement importantes de L.C.R. qu'il est difficile d'obtenir quand on sait le nombre de renseignements qui sont demandés à l'occasion

d'une ponction lombaire. En outre l'expérimentation doit pouvoir être effectuée pendant un temps relativement long, ce qui rend l'emploi des inhibiteurs des pseudo-cholinestérases obligatoire et un dosage parallèle en présence d'un inhibiteur sélectif de l'AChE souhaitable.

Ceci aboutit au fait que si cette technique fut une excellente méthode de recherche fondamentale, l'utilisation de cette technique en pratique hospitalière pose des problèmes quasiment insurmontables. Certains auteurs, malgré les difficultés, ont tenté de faire des dosages en clinique. Il s'ensuit une dispersion importante des résultats et les hypothèses pathogéniques qui en découlent sont souvent contradictoires. Ceci sera plus longuement abordé dans un chapitre ultérieur.

II . 1 . 2 . LES METHODES SPECTROPHOTOMETRIQUES:

La méthode colorimétrique de Ellman et coll. (1960) -061- a été la plus utilisée. Le substrat employé ici, l'acétylthiocholine est scindé sous l'action de l'AChE en acétate d'une part et en thiocholine d'autre part, qui en présence de dithiobisnitrobenzoate, donne une couleur jaune lisible à 412 mμ.

Les résultats de cette méthode sont bons en ce qui concerne les broyats de tissu nerveux et les hématies. Les constantes cinétiques sont convenables et les taux trouvés pour le cerveau total de rat est très voisin du nôtre.

Cette méthode semble à priori facile à appliquer en clinique. En fait , si cette méthode est simple et rapide, en ce qui concerne les broyats tissulaires pour lesquels les auteurs la recommandent, la quantité minimum de L.C.R. qu'elle

permet de doser est de 2 ml. Cette quantité étant à la limite de la sensibilité. Il est donc possible en appliquant cette technique d'obtenir de bons dosages de L.C.R. en concentrant plusieurs fois le L.C.R., ce qui en pratique clinique n'est que rarement réalisable.

Toutes les autres techniques colorométriques sont des variantes de celle-ci. Nous n'en citerons que deux : celle de Lowry et coll.(1954) -136- qui utilise un indicateur coloré et celle de Gal et Roth (1957) -071- dont le substrat est aussi le chlorure d'acétylthiocholine.

Salafsky (1965) -188- a comparé deux méthodes colorimétriques : celle de Ellman et coll. décrite ci-dessus, celle de Kramer et Gamson (1958) -121- qui utilise une coloration bleue lue à 625 mμ due à l'hydrolyse par l'enzyme de l'acétate d'indophenyl, et une méthode classique utilisant l'appareil de Warburg. Les dosages sont effectués sur des broyats de diaphragme. Les résultats sont relativement divergents et les taux trouvés par la méthode de Kramer et Gamson sont supérieurs à ceux obtenus par la méthode d'Ellman qui donne, elle-même, des chiffres quelque peu supérieurs à ceux de la méthode classique. Cette étude illustre bien la critique qui est faite à la plupart des méthodes colorimétriques qui utilisent des substrats totalement de synthèse; il est alors beaucoup plus difficile d'interpréter les résultats, et en pathologie, dans l'hypothèse d'une enzyme inactive sur son substrat naturel, il n'est pas évident, vue la complexité de la molécule, que le dosage permette de mettre en évidence ce défaut.

Une méthode assez voisine est la méthode fluorométrique de Prince (1965) -181-182- qui utilise l'iodure de

1-méthyl-7-hydroxyquinolinium comme substrat. Prince obtient par cette méthode des résultats qui semblent valables mais seules des préparations connues d'AChE ont été explorées et nous n'avons pas retrouvé dans la littérature d'auteurs ayant utilisé cette technique. Des essais pour monter cette technique, se sont heurtés au fait que le substrat de la réaction n'est pas commercialisé, et qu'il faut donc le synthétiser. Entre nos mains, le mode opératoire préconisé par l'auteur ne nous a pas permis de conduire cette synthèse à son terme.

II . 1 . 3 . LES METHODES RADIOISOTOPIQUES :

L'utilisation des produits marqués constitue un progrès considérable.

Les différentes méthodes radioisotopiques utilisent toutes un substrat dont le carbone marqué va se retrouver au niveau de l'acide acétique. Elles peuvent être classées en deux grandes classes: d'une part les méthodes dosant le substrat marqué restant, d'autre part les méthodes dosant le CH_3^*COOH libéré.

Dans la première série , il existe deux possibilités
--- soit doser le substrat restant après l'avoir isolé, ce qui, à notre connaissance, n'a pas été fait;
--- soit doser le substrat restant après avoir éliminé le CH_3^*COOH libéré.

Une simple critique méthodologique révèle que dans ce type de technique, pour que la différence de substrat entre le début et la fin de l'expérience soit mesurable, il faut soit introduire dans la réaction un faible excès de substrat, soit mesurer après un temps très long. Aucune des deux solu-

tion ne correspond aux conditions requises.

Winteringham (1963) -226- arrête l'incubation effectuée à 25° par l'addition d'acide et d'inhibiteur en excès dans une cupule lisse et préalablement séchée. Il compte ensuite la radioactivité résiduelle.

Cette méthode procède par différence du substrat marqué avant et après incubation. Deux critiques particulières à cette méthode doivent être faites : d'une part il est possible qu'une partie du substrat soit hydrolysée avant l'emploi, d'autre part son évaporation est difficilement contrôlable. Cette méthode ne mesure que le tiers de l'activité enzymatique.

Nous laisserons donc ces méthodes pour voir celles de la seconde série qui dosent directement le CH_3^*COOH libéré. Certaines de ces méthodes vont isoler l'acétylcholine, les autres isoleront l'acétate.

Parmi celles mesurant le substrat, nous évoquerons quatre méthodes. La méthode de Reed et coll (1966) -183- appliquée aux tissus nerveux par Berg et Maickel (1968)-O23-. Le substrat utilisé est l'iodure d'acétyl-1- $^*\text{C}$ -choline. L'acétate est libéré lors d'une incubation de 10 mn à 37°. La réaction est stoppée par l'éthanol absolu. A ce mélange, on ajoute de la Rexyn 101 qui est une résine cationique pendant 20 s. Puis une filtration est effectuée sur papier Whatman n° 2. Malheureusement cette méthode ne permet d'obtenir qu'environ 50 % de l'activité présente.

Mc Caman (1968) -139- publie une méthode délicate qui peut être considérée comme une excellente méthode de référence. Le substrat utilisé est le même que celui de Berg et Maickel. L'incubation est de 30 mn: durée pour laquelle la

réaction est linéaire. Cette incubation est stoppée par immersion dans la glace pilée. Sont alors ajoutés 2,5 μ l de choline à 50 mM diluée dans de l'acide chlorhydrique 1,5 N d'une part, et 5 μ l d'HCl 0,5 N saturé par du reineckate d'ammonium. Une centrifugation permet de recueillir un surnageant de 15 μ l qui est introduit dans un second tube contenant 1 μ l de choline à 100 mM et 5 μ l de sel de reineckate. Une seconde centrifugation permet de séparer le surnageant qui contient l'acétate marqué et de le compter à l'aide d'un compteur à scintillations.

Cette méthode permet d'obtenir pour le cerveau total de rat un taux de 610 μ M/h/g de tissu. Elle permet également d'obtenir un dosage valable dans le L.C.R. .

Le seul reproche que l'on peut faire à cette technique est la grande dextérité et le calme qu'elle exige du manipulateur. Cette difficulté vient du fait que les volumes sont très réduits et que l'acétate libéré qui est en quantité relativement faible (1000 dpm) pour les L.C.R. et inférieur à 100 dpm pour les blancs est contenu dans le surnageant dont il faut prendre la presque totalité, au dessus d'un culot dont l'activité est environ de 120 000 dpm. Il est bien évident que la moindre parcelle de sel de Reinécke entraînée par la pipette contient une radioactivité plus importante que la totalité du surnageant.

En 1969 Siakotos et coll -193- modifient la méthode de Mc Caman en remplaçant le sel par une résine cationique: Amberlite CG 120 . Les réserves qui peuvent être apportées à cette technique sont identiques à celles faite pour la précédente .

Pendant que nous effectuions les travaux préliminaires et les dosages des différents L.C.R. Ehrenpreis et coll. (1970) -060- dont nous connaissons les importants travaux sur les problèmes posés par le récepteur de la choline, ont publié une méthode proche de celle de Siakotos mais dont le but est plus précisément de mesurer la présence de l'enzyme in situ. Cette méthode semble être une des plus valables. Le substrat non dissocié est retenu par une résine cationique Biorad AG, 50 W X 8 ,200-400 mesh. L'effluent est directement compté. La résine étant disposée dans une colonne, il n'y a, lors des manipulations, aucun risque d'entraînement. Cependant, nous craignons qu'une telle méthode comporte un risque d'erreur par excès. En effet, la quantité de résine étant faible, il semble possible qu'elle puisse être saturée de substrat et qu'une partie de celui-ci soit alors amené à passer directement dans l'effluent.

Les dernières méthodes vont essayer d'isoler l'acétate lui-même. Potter (1966) -179- et Gaballah (1968) -069- séparent l'acide acétique libre marqué par extraction dans du toluène alcool isoamylique puis compté. La différence entre les deux méthodes est essentiellement du domaine de la manipulation. Ces méthodes ne dosent que le tiers de la quantité d'enzyme présente. Il faut reconnaître que Gaballah a fait une étude détaillée sur la présence de l'enzyme au niveau sub-cellulaire qui est en accord avec les travaux ultérieurs. Ces résultats sont rapportés dans un chapitre précédant.

En dehors de la méthode de séparation par solvant, il est possible de séparer l'acétate par fixation sur résine anionique et de l'éluer ensuite. C'est cette possibilité qui est utilisée dans la méthode proposée.

II . 2 . NOTRE METHODE :

Pour les raisons que nous venons d'évoquer, nous nous sommes donc attachés à réaliser une méthode à la fois simple et précise.

II . 2 . 1 . LE PRINCIPE :

Pour déterminer l'activité acétylcholinestérasique d'un broyat tissulaire ou d'un L.C.R. nous le mettons, convenablement dilué, en présence du substrat naturel de l'enzyme marqué au carbone 14 : l'acétyl-1-¹⁴C-choline sous forme d'iodure. Sous l'action de l'enzyme l'acétyl va être libéré. Il est alors facile de le fixer sur une résine. Le substrat non dissocié et la choline libérée ne seront pas retenus. L'acétyl fixé sera alors élué par une solution d'acide acétique et la radioactivité d'un aliquot de l'éluat sera compté. A partir de ce résultat, un calcul permet d'obtenir le nombre de micro-moles d'acétylcholine scindée par heure et par mg de tissu ou par heure et par 100 ml de L.C.R. .

II . 2 . 2 . LE MATERIEL :

Le matériel nécessité par un tel dosage est excessivement réduit pour celui qui possède un compteur à scintillations. Nous avons utilisé un bain-marie à 37° équipé d'un système permettant l'obtention d'une température homogène et une série de colonnes en verre de 20 cm dont le diamètre intérieur mesure 5 mm. Ces colonnes sont préalablement lavées pendant 24h dans du mélange sulfochromique, puis rincée à

l'eau permutée bidistillée. Elles sont enfin séchées à l'étuve à 100° .

Les produits utilisés sont de trois types : ceux se rapportant au substrat, ceux contenant l'enzyme à doser, et ceux utilisés en cours de dosage.

Le substrat utilisé est l'acétylcholine mais afin que le dosage puisse être d'un coût faible et les risques de contamination radioactive minimes, tout en saturant l'enzyme de substrat, nous avons substitué une partie du substrat marqué par du substrat froid : chlorure d'acétylcholine commercialisé par les laboratoires Lematte et Boinot: 52, rue La Bruyère, Paris IX, sous le nom d'ACECOLINE. Ce produit est préparé dans du tampon phosphate à une concentration de 7,55mM.

L'iodure d'acétyl-1-¹⁴C-choline est obtenu à la New England Nuclear Corp. avec une activité spécifique de 2,075 mc/mM . La solution mère est réalisée dans de l'eau distillée à une concentration de 20mM. Elle est stockée à -18°, répartie en petite quantité, ce qui permet au moment du dosage de ne décongeler que la quantité nécessaire. Au moment de l'emploi 0,05 μ Curie sont diluées dans 50 μ l de tampon.

Les produits contenant l'enzyme que l'on désire doser sont, en ce qui nous concerne, soit des L.C.R., soit des structures encéphaliques. Les L.C.R. sont utilisés purs, mais ils peuvent être dilués au 1/2 ou au 1/4 pour des raisons pratiques. Ceci permet de faire un dosage correct avec 50 μ l de L.C.R., blanc compris. A titre expérimental nous avons dilué des L.C.R. au 1/10 . Nous ne recommandons cependant pas une telle dilution car dans le cas d'une diminution pathologique, les résultats risqueraient d'être d'interprétation

délicate. Les L.C.R. hémorragiques doivent être éliminés systématiquement.

Nous avons également effectué des dosages sur des structures encéphaliques de rat. A ce moment une dilution de l'homogénéisat dans du saccharose est nécessaire. Après plusieurs essais nous avons standardisé nos concentrations à 1 mg de tissu frais par ml de saccharose 0,25 N.

Les blancs sont obtenus par ébullition pendant deux heures, puis placés au réfrigérateur à 0°.

Des produits intervenant dans le protocole, le plus important est la résine échangeuse d'anion sous sa forme chlorée. Nous avons utilisé la Dowex 1 X 8 , 200/400 mesh. Il convient, avant tout emploi de laver cette résine par une succession de rinçages par de la soude 2 N, puis de l'eau distillée permutée, puis par de l'acide chlorhydrique 2N. Cette opération étant réalisée plusieurs fois, la résine est alors rincée par de l'eau bidistillée et permutée. La qualité de l'eau est importante car c'est un facteur non négligeable dans la valeur des blancs. Nous avons, pour des raisons de commodité été amenés à utiliser, au début de ce travail, des eaux traitées de façon différentes et nous avons observé une amélioration sensible des blancs lorsque l'eau utilisée était permutée et bidistillée. Cette méthode permet également de régénérer la résine après usage.

La résine ainsi préparée est placée dans les colonnes bouchées avec de la laine de verre, sur une hauteur de 1cm. Pour éviter que de la résine ne reste le long de la paroi, nous rinçons la colonne une dernière fois avec environ 4 ml d'eau permutée bidistillée.

L'arrêt de la réaction après l'incubation est réalisée avec un mélange éthanol-eau (76-24).

L'élution est faite par l'adjonction d'acide acétique 0,5N.

La lecture au compteur à scintillations est effectué dans un mélange d'éthanol-méthanol (1/3) et de toluène scintillant préparé en diluant dans 1 litre de toluène 0,1 g de POPOP et 4g de PPO.

Les dilutions citées ci-dessus sont faites dans une solution de saccharose 0,25 N dans certains cas, dans d'autres, nous avons préféré le tampon phosphate pH 7,4 (K_2HPO_4 - KH_2PO_4).

Nous avons, de préférence, utilisé les produits "Merck".

II . 2 . 3 . LE PROTOCOLE :

Dans des tubes à hémolyse, contenant chacun: 50 μ l de chlorure d'acétylcholine (7,55 mM) et 50 μ l d'iodure d'acétyl-1-¹⁴C-choline (0,45 mM) on ajoute 100 μ l de substance à doser préalablement diluée.

Ces tubes sont portés au bain-marie à 37° pendant 15 mn. Ce temps écoulé, les tubes sont extraits en bloc et le portoir est plongé dans un bain de glace. Immédiatement, la réaction est stoppée par l'adjonction de 1 ml d'éthanol-eau (76-24).

Le contenu de chaque tube est alors transféré totalement sur une colonne de Dowex 1 X 8 préalablement préparée.

Un lavage de la colonne est réalisé par 4 ml d'eau permutée et bidistillée.

La totalité de l'eau passée, des tubes secs sont

placés sous les colonnes pour recueillir l'éluat qui est obtenu avec 0,5 ml d'acide acétique 0,5 N.

Un aliquot de 200 μ l est alors repris pour le comptage réalisé avec un compteur Packard Tri-Carb modèle 3320 après adjonction de 4 ml d'éthanol-méthanol et 10 ml de toluène scintillant. Un calcul classique permet d'avoir directement le nombre de uM d'ACH hydrolysée par heure et par mg de tissu ou pour 100 ml de L.C.R..

II .2 . 4 . JUSTIFICATION DE LA METHODE :

La première éventualité que nous avons dû éliminer était une hydrolyse spontanée de l'acétyl-choline par la résine. Pour étudier ce problème, nous avons placé en haut de la colonne une quantité connue de substrat marqué non hydrolysé et nous avons recueilli d'une part la totalité du produit de passage puis du produit de lavage , d'autre part, l'éluat effectué dans les conditions standards. Les résultats ont montré que le substrat non hydrolysé se retrouvait au niveau du produit de lavage pour 99 % et au niveau de l'éluat pour 0,2 % . En lavant la résine avec une grande quantité d'eau il est possible d'obtenir un total de 100 % .

Inversement, nous avons testé le comportement de la résine vis à vis d'un substrat totalement dissocié.Ce qui revient à vérifier l'absence de rétention de l'acétate par la résine .La dissociation fut réalisée en mettant une quantité connue de produit marqué en présence d'un grand excès d'homogénéisat de noyau caudé de rat. L'incubation à 37° fut prolongée pendant une heure. Dans ces conditions expérimentales, on peut admettre que la totalité du substrat est hydrolysé

en choline d'une part, et en acétate d'autre part. Le passage sur Dowex 1 X 8 d'une quantité connue permet d'obtenir 96 % dans l'éluat alors que le lavage préalable n'avait entraîné que 0,26 % de la radioactivité totale. Ceci, dans les conditions standards. Une élution plus complète peut être réalisée mais elle se fait selon une courbe hyperbolique et nécessite alors une quantité très importante d'acide.

Ces deux résultats étant satisfaisants, il est alors possible de procéder à l'étude des différents paramètres pour à la fois vérifier les résultats, et calculer des dilutions de façon à pouvoir dans tous les cas travailler à concentration saturante en substrat.

Tous les travaux préliminaires aux dosages ont été effectués sur noyau caudé de rat dilué dans une solution de saccharose (0,25 N)

L'étude de la réaction en fonction de différents pH et en fonction de la température permet de choisir des conditions expérimentales proches des conditions physiologiques : pH 7,4 et 37°. Ces faits sont rapportés par de nombreux auteurs.

L'étude en fonction du temps était beaucoup plus importante car le substrat que nous utilisons, s'il a pour principal avantage d'être celui sur lequel s'exerce l'enzyme dans la nature a l'inconvénient de pouvoir être attaqué dans des laps de temps assez longs et heureusement, avec un rendement très médiocre par d'autres enzymes et en particulier les pseudo-cholinestérases. En fait, en ce qui nous concerne ceci était presque un faux problème puisque la présence de telles enzymes au niveau du S.N.C. et surtout du L.C.R. est

relativement faible. Cependant c'est un écueil que nous avons tenu à éliminer en prenant un temps suffisamment court pour qu'à ce moment, la courbe de la dégradation du substrat en fonction du temps soit parfaitement linéaire. (cf. fig. n° 4)

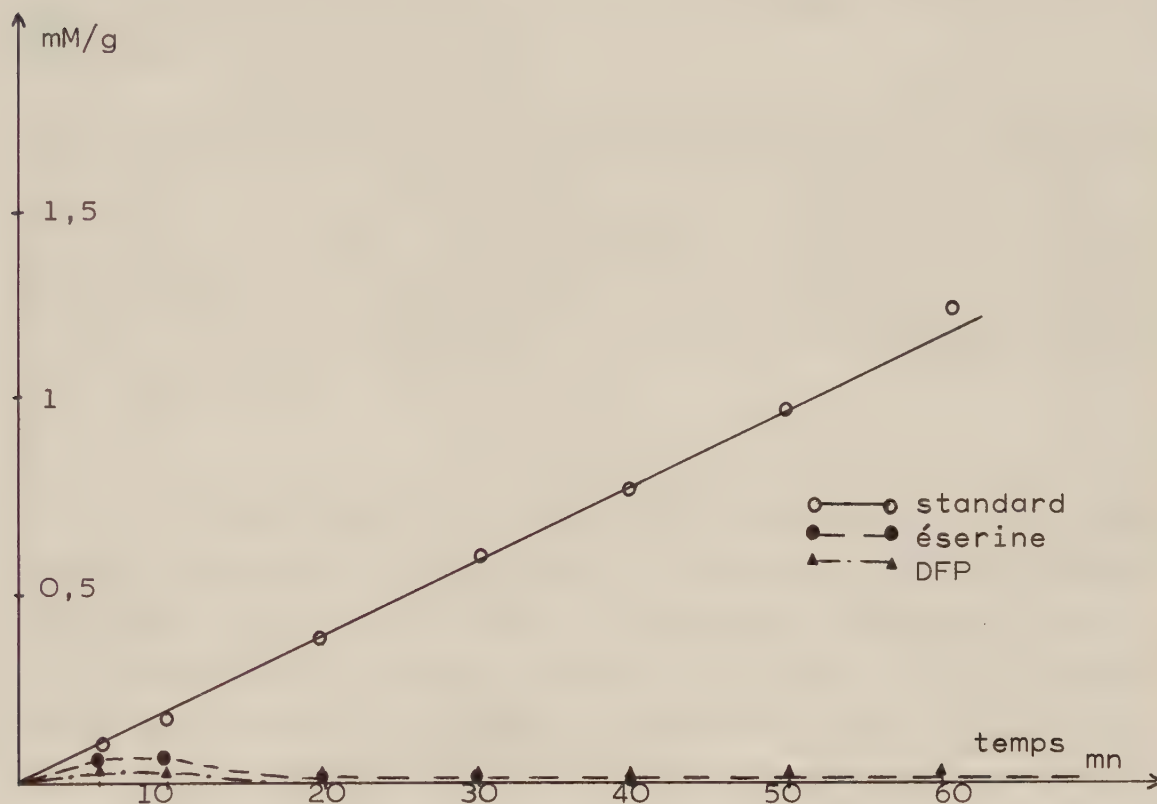


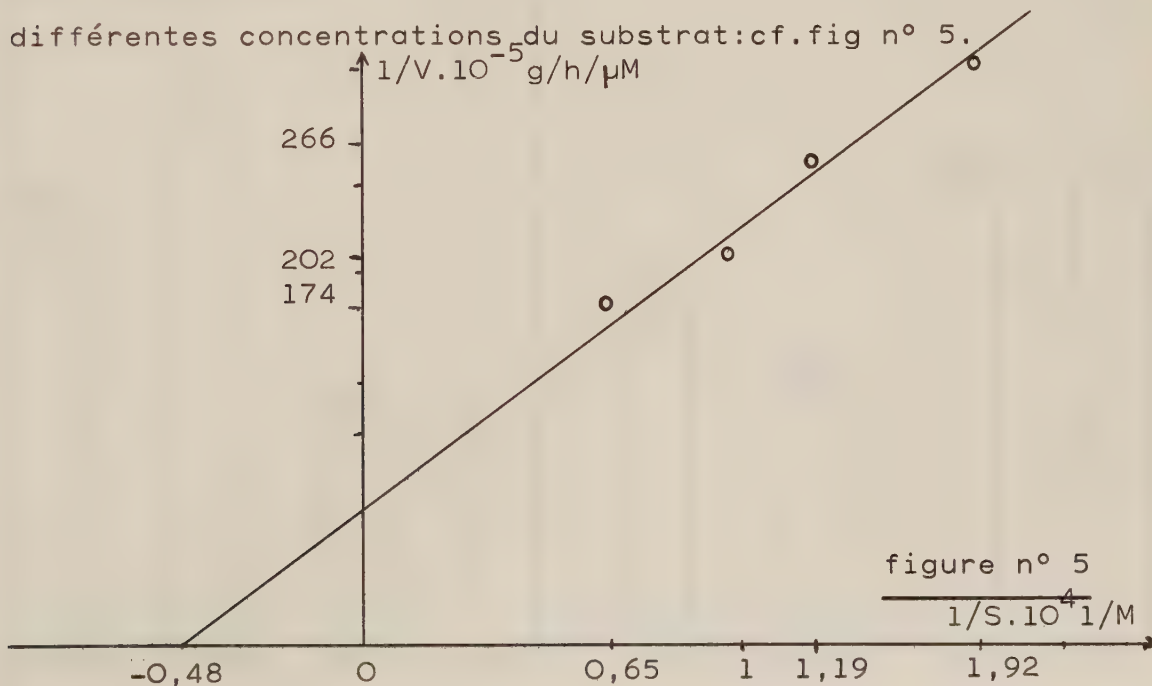
figure n° 4 : Cinétique de la réaction enzymatique.

Cette courbe est, dans les conditions expérimentales une droite pendant les 60 premières minutes de la réaction. Pour des raisons de rapidité de la technique, nous avons choisi une durée d'incubation de 15 mn. Si nous n'avons pas pris un temps plus court c'est afin de rendre les temps morts négligeables par rapport à la durée d'incubation. Bien qu'excessivement réduits dans cette méthode, ils doivent cependant être tenus comme existants du fait de la rapidité extrême de

l'action de l'enzyme considérée. Pour vérifier que cette durée d'incubation était suffisante pour absorber les temps morts qui sont en fait représentés par le temps de répartition dans les tubes à hémolyse, nous avons effectué des dosages avec des durées d'incubation plus longs: 30 et 45 mn. Les résultats furent identiques.

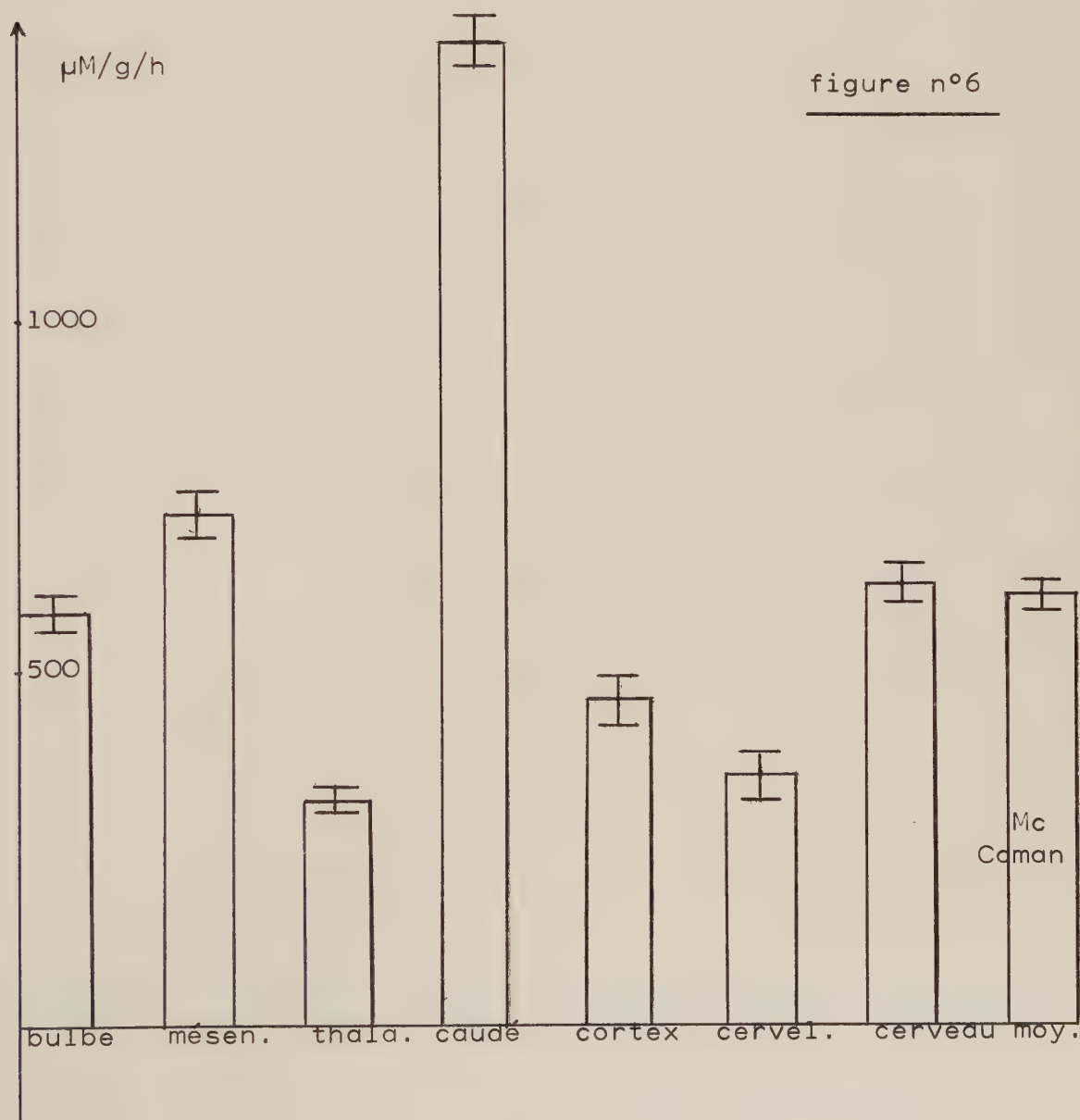
La spécificité de la méthode fut vérifiée d'une part par l'action de l'Eserine, d'autre part par celle du DFP. (cf.fig.n° 4) Les deux inhibiteurs permirent d'obtenir une inhibition totale de l'activité enzymatique. Ces inhibiteurs furent respectivement utilisés à des concentrations de 8 mM et 10 mM.

Pour vérifier la méthode, nous avons effectué deux types de dosages: tout d'abord le calcul de la constante de Michaelis qui n'est ici qu'un Km apparent puisqu'il s'agit d'un homogénéisat de noyau caudé de rat. Ceci fut fait avec différentes concentrations du substrat: cf.fig n° 5.



Nous obtenons un K_m apparent de $2,1 \cdot 10^{-4} M.l^{-1}$. Ce qui correspond à ce que trouve Mc Caman pour le muscle et les hématies d'une part, et Patocka et Bajgar (1969)-168- d'autre part au niveau du noyau caudé humain. Ces valeurs sont respectivement de 2 et $2,2 \cdot 10^{-4} M.l^{-1}$.

Ensuite, nous avons effectué des dosages au niveau de différentes structures de cinq cerveaux de rats. (cf.fig. n°6).



Là encore, nous avons retrouvé les résultats de la littérature, et en particulier nous trouvons pour le cerveau total de rat un taux d'activité (626 $\mu\text{M/g}$ de tissu/h) qui n'est probablement pas significativement différent de celui que trouve Mc Caman (1968) -139- qui est de 610 $\mu\text{M/g}$ de tissu/h.

Une expérimentation portant sur cinquante rats confirme ces dosages et sera exposé dans la troisième partie de ce travail.

--*--
*

II . 3 . DISCUSSION :

En fonction de l'analyse que nous avons faite précédemment, il est évident que si un certain nombre de méthodes restent valables en ce qui concerne le dosage de structures encéphaliques qui possèdent un niveau d'activité relativement élevé, même en ce qui concerne les plus inertes, très peu de méthodes permettent sans concentration préalable ou sans quantité importante, un dosage dans le L.C.R. .La seule méthode que nous considérons comme apportant suffisamment de sensibilité pour réaliser dans des normes de sécurité confortables des dosages de L.C.R. est la technique de Mc Caman (1968)-139- Ceci entraîne plusieurs conséquences: tout d'abord, les auteurs s'intéressant à la pathologie, n'ayant jamais utilisé cette méthode, à notre connaissance, nous citerons leurs travaux avec une extrême réserve; (Les auteurs ayant pour la plupart utilisé la méthode d'Ammon soit après concentration du L.C.R., ce procédé apportant une certaine sensibilité mais également un risque d'erreur non négligeable,

soit sur des quantités importantes de L.C.R. et à ce moment les conditions physiologiques ne sont pas toujours respectées.) Ensuite, cette technique demandant attention et dextérité, nous lui avons préféré la nôtre qui permet une utilisation beaucoup plus large et des séries importantes sont réalisables.

Ayant conservé la sensibilité de la technique de Mc Caman puisque nous retrouvons tous ses résultats, nous avons obtenu une technique maniable pouvant s'appliquer à des échantillons très réduits puisque nous avons réalisé des dosages sur des L.C.R. de rat et pouvant permettre des séries

importantes puisqu'en une journée, nous avons traitées 250 colonnes.

Le seul problème qui reste à surmonter est celui de la corrélation entre la pathologie et les L.C.R. obtenus par ponction lombaire.

Ceci fera l'objet de la dernière partie de ce travail.

--*--
*

III . L'AChE ET LA PATHOLOGIE :

III . 1 . DEFINITION D'UN TAUX NORMAL:

III . 1 . 1 . Le choix des témoins

III . 1 . 2 . Les apports de la littérature

III . 2 . L'ACHE EN NEUROLOGIE :

III . 2 . 1 . Les données de la littérature

III . 2 . 2 . Nos observations

III . 3 . L'ACHE ET QUELQUES SYNDROMES :

III . 3 . 1 . L'ACHE dans la S.E.P.

III . 3 . 2 . L'ACHE dans les méningites

III . 3 . 3 . L'ACHE dans les processus néoplasiques

III . 3 . 4 . L'ACHE dans les épilepsies

III . 3 . 5 . L'ACHE dans quelques observations particulières

III . 4 . L'ACHE DANS LA MALADIE DE PARKINSON:

III . 4 . 1 . Les observations

III . 4 . 2 . Discussion

III . 4 . 3 . Expérimentation chez l'animal

III . 4 . 4 . Nos résultats

III . L' A C h E E T L A P A T H O L O G I E

La dernière partie de ce travail va être consacrée à l'exploration de la pathologie neurologique. Il nous faut rappeler ici, l'aspect non anodin de la ponction lombaire qui explique la difficulté de tous les auteurs pour obtenir un lot de témoins "normaux" d'une part, d'autre part le fait que nous n'avons pas toujours pu obtenir les prélèvements que nous aurions souhaités dans des syndromes qui nous auraient semblés intéressants mais où la ponction pouvait être aggravante pour le malade et non d'un intérêt immédiat évident pour celui-ci.

Johnson (1971) -090- qui a pu obtenir des volontaires n'a malheureusement pas effectué de dosage d'AChE sur ces précieux liquides. Nous n'avons , pour notre part, pas eu cette possibilité.

III . 1 . DEFINITION D'UN TAUX NORMAL:

Celle-ci est évidemment indispensable pour envisager et rechercher d'éventuelles variations pathologiques. Mais si elle est toujours difficile, et sujet à caution le témoin normal est particulièrement malaisé à définir en ce qui concerne l'AChE dans le L.C.R. . En effet cette enzyme, en dehors du système nerveux central, existe au niveau de nombreux autres tissus et si comme nous supposons, l'AChE du L.C.R. provient du tissu nerveux proximal, nous ignorons si une maladie métabolique générale ne peut pas intervenir par des mécanismes indirects, au niveau de la synthèse ou au niveau des précurseurs. En outre toutes les maladies dites de médecine

générale qui peuvent entraîner une modification des parois vasculaires et des "systèmes de séparation" au sens large, ne provoquent-elles pas des variations d'activité?

III . 1 . 1 . LE CHOIX DES TEMOINS :

Alors que nous avons refusé de prendre comme témoin des malades pithiatiques, nous avons eu la chance d'obtenir des L.C.R. de cinq sujets sans thérapeutique antérieure, sans signe pathologique venus à l'hôpital neurologique pour bilan de sommeil et ils nous ont semblé des témoins satisfaisants.

Un cycle circadien ayant été signalé pour certaines enzymes, et bien qu'il n'y ait pas eu d'étude particulière pour l'AChE, nous précisons que ces prélèvements ont été réalisés entre 11h et 13h; il en est de même pour tous les malades.

Nos déterminations ayant abouti aux taux suivants: 32,54,33,47,79 $\mu\text{M}/\text{h}/100\text{ml}$, soit un taux moyen de $49 \pm 8 \mu\text{M}/\text{h}/100 \text{ ml}$: nous admettons comme normal un taux voisin de 50 $\mu\text{M}/\text{h}/100 \text{ ml}$.

III . 1 . 2 . LES APPORTS DE LA LITTERATURE:

Les auteurs qui ont avancé un taux normal sont au nombre de 4 mais dans tous les cas il ne s'agit pas de volontaires mais de malades pris comme témoins normaux. (Nous regrettons qu'aucun de ces auteurs ne rapportent les observations ou les critères qui les ont conduit à considérer ces malades comme témoins.) Ceci rend difficile une comparaison valable, d'autant que trois des résultats sont obtenus par la méthode

de Warburg (nous avons dit les réserves qu'il convenait d'apporter à cette technique); le dernier dosage effectué par Johnson (1971) -090- par la méthode de Siakotos (1969) -193- qui est proche de celle de Mc Caman, ne donne aucun renseignement sur le choix des "normaux".

Nous pensons que son taux double du nôtre vient de l'échantillonnage des témoins.

auteurs	année	réf.	nombre	$\mu\text{M}/100\text{ml/h}$	méthode
Johnson	1971	-090-	7	105	Siakotos
Plum	1959	-173-	7	158	Ammon
Svensmark	1958	-202-	12	39	Ammon
Tower	1949	-212-	x	89	Ammon

Bien que notre échantillonnage nous ait semblé valable, il ne comporte que cinq sujets. Seuls des dosages sur de nombreux volontaires permettraient une estimation plus satisfaisante.

III . 2 . L'ACHÉ EN NEUROLOGIE :

Dans ce domaine, la comparaison des résultats obtenus par les différents auteurs est difficile, ceux-ci ayant réalisé des moyennes sur des échantillonnages très différents. Nous considérons donc que la seule possibilité pour apporter un élément de comparaison est de rapporter ici la liste des différentes observations qui ont permis de constituer ces moyennes.

III . 2 . 1 . LES DONNEES DE LA LITTERATURE:

Le premier auteur à publier un taux moyen est Kalsbeck (1950) -O93- qui utilise la méthode d'Ammon . Il obtient un taux moyen de 113 $\mu\text{M}/100\text{ml/h}$, à partir de 15 dosages se répartissant comme suit :

Tabès dorsal	3	observations
Epilepsie	2	"
Névrite rétrobulbaire	1	"
Syphilis congénitale	"	"
Compression médullaire par hernie	"	"
Sciatique	"	"
Diabète insipide	"	"
Syringomyèlie	"	"
Syndrome cérébelleux	"	"
Hypertension intracérébrale	"	"
Dégénérescence tapétorétinienne	"	"

Quelques années plus tard Jefferson (1954) -O88- en utilisant la même technique trouve un taux moyen de 75 $\mu\text{M}/100$ ml/h à partir de 52 observations ainsi réparties :

Tumeur cérébrale: neurofobrome acoustique	2	cas
craniopharyngiome	1	"
gliome	3	"
méningiome	2	"
Trouble vasculaire cérébral	4	"
Spondylose cervicale	3	"
Hydrocéphalie congénitale	1	"
Atrophie corticale	2	"
S.E.P.	14	"
Epilepsie	2	"
Migraine	1	"
Trouble moteur	3	"
Myopathie	1	"
Syphilis nerveuse	2	"
Otosclerosis	1	"

Hydrencéphalie	4	malades
S.E.P.	6	"
Leucémie et lymphome	8	"
Guillain-Barré	2	"
Méningite	3	"
Démence sénile	7	"
Atrophie optique	1	"
Névralgie faciale	1	"
Avitaminose B 12	1	"
Processus tumoral cérébral	1	"
Ependymome	1	"
Neurinome acoustique	1	"
Encephalite	1	"
Syphilis	1	"

Il est bien évident qu'une telle dispersion dans les syndromes rend toute comparaison entre les taux moyens hasardeuse. Il nous a cependant semblé important de la rapporter ici car il a parfois été tiré des conclusions hâtives à partir de ces chiffres. Nous nous bornerons à mettre en parallèle les valeurs témoins de ces auteurs avec les chiffres moyens qu'ils ont obtenu chez des malades souffrant d'affection neurologique.

Nous devons signaler que Kalsbeck (1950) -O93- et Bernsohn (1958) -O24- ne donnent aucun taux considéré comme normal.

Svensmark (1959) -202- obtient un taux moyen de 30 avec un taux normal de 39 $\mu\text{M}/100\text{ml/h}$.

Plum et Fog (1958) -173- obtiennent un taux moyen de 104 avec un taux normal de 158.

Johnson obtient un taux moyen de 117 avec un taux normal de 105 $\mu\text{M}/100\text{ml/h}$.

Ceci permet de constater que les deux auteurs utilisant la méthode d'Ammon trouvent des taux moyens pathologiques

inférieurs à ceux trouvés chez des malades considérés comme normaux, alors que le résultat est inverse chez le dernier auteur. En outre nous devons remarquer que les différences de taux sont relativement faibles et nous ne pensons pas qu'elles soient significativement différentes. C'est pour essayer de situer nos résultats par rapport à ceux de la littérature que nous avons fait une moyenne à partir de nos dosages. Nous devons cependant remarquer que ce processus est statistiquement sans signification puisque les populations ne sont pas comparables.

III . 2 . 2 . NOS OBSERVATIONS :

Nous avons effectué des dosages sur des L.C.R. de provenance très diverse. Nous exclurons ici toutes les observations concernant des patients atteints de maladie de Parkinson n'ayant rencontré dans la littérature qu'un résultat de Johnson concernant ce syndrome.

Etant donné le nombre des observations, il nous a semblé préférable de les présenter dans un tableau de façon succincte avec le taux d'ACHé et de protéines que nous avons trouvé au niveau du L.C.R. . A ce propos, nous noterons que les deux chiffres sont relativement indépendants. Ceci avait d'ailleurs été une des conclusions de Johnson (1971)-090-. Tous les dosages effectués sur des L.C.R. dont l'étude cytologique montrait la présence de GR même en quantité minime ont été écartés.

Les observations présentées ici, sont numérotées de 6 à 53, les observations de 1 à 5 étant représentées par les témoins et de 54 à 96 par les malades atteints de maladie de

Parkinson :

N°	Résumé de l'observation	AChE μM/100ml/h	Protéines g/l
6	Maladie de Creutzfeld Jacob	74	0,16
7	Paralysie périphérique du sciatique poplitée ext. et anti-brachial chez un gastrectomisé E.M.G. normal discaliémie?Paralysie périodique hypocalcémique	169	0,60
8	Migraineuse. Angiome occipital avec hématome intra-cérébral jusqu'au carrefour.	142	0,72
9	Coma: foyer temporal : abcès cérébral.	32	0,50
10	Paraplégie spasmodique. Atteinte de la sensibilité profonde. Myélopathie cervicale?	262	0,10
11	Paraplégie spasmodique + syndrome cérébelleux hérédodégénérescence.	171 54	0,20 0,22
12	S.E.P.	62	0,25
13	Paraplégie spasmodique Jaylcourgeot. S.E.P. début brutal évolution progressive.	14	0,38
14	S.E.P. : Deux poussées évidentes	56	0,18
15	S.L.A.	48	0,24
16	Paralysie faciale périphérique récidivante ayant presque totalement disparu .	38	0,15
17	Monoplégie du membre supérieur droit et aphasie vasculaire.	67	0,39

18	Anévrisme de la communicante, Hémorragie locale.	14	0,13
19	Hématome sous-dural bilatéral avec paralysie de fonction. Tracé neurogène diffus.	46	0,20
20	Atteinte C5-C6 post-opératoire (élongation).	71	0,40
21	Amaurose transitoire très fugace au cours d'un épisode fébrile Episode méningé-grippal?	121	0,12
22	Paraplégie spasmodique progressive.	16	0,14
23	Céphalée, perte de connaissance? Clinique R.A.S.	27	0,10
24	Lombalgie	33	0,30
25	Algie pluriradiculaire chez un opéré pour hernie discale. Pas de troubles moteurs ni sphinctériens. Deux mois après: guérison.	54	0,32
26	Hémorragie méningée bilan angio-carotidien vertébral normal.	93	0,60
27	Amyotrophie scapulaire: polio-ant.chronique.	69	0,13
28	Lumbago-sciatalgie hystérique	18	0,20
29	Comitialité tardive.Origine?	52	0,20
30	Baisse acuité visuelle par arachnoïdite.	64	0,14
31	Névrite optique chez malade présentant des manifestations sé-nestésiques.	72	0,20

32	Comitialité temporale .Etiologie?	142 124	2,60 2,10
33	Polyradiculonévrite diabétique.	144	0,82
34	Syndrome de la queue de cheval post-traumatique.	161	0,75
35	Douleur pré-cordiale chez un éthylisme.	228	0,21
36	Lombalgie par dysplasie fibreuse à localisation crânienne et céré- brale .	69	0,18
37	Métastase adéno-carcinomateuse temporopariétale droite.	100	0,70
38	Syndrome cérébello-spasmodique progressif S.E.P. familiale?	128	0,22
39	Glioblastome temporal gauche isomorphe opéré.Méningite à pyo- cyanique post-opératoire.	94	2,40
40	Tumeur du tronc cérébral ou encé- phalite avec héli-syndrome sensi- tif droit V.VII.IX.X.	78	0,34
41	Glioblastome isomorphe chez un hypertendu.	135	0,20
42	Glioblastome intraventriculaire envahissant le ventricule:ini- tialement radiothérapie.	27	0,68
43	Métastase cérébral du cancer du sein : radiothérapie.	37	0,18
44	Hématome sous dural et intra- frontal droit. Tumeur frontale: méningiome.	122	0,20
45	Glioblastome temporal profond.	146	0,70

46	Compression médullaire	111	0,72
47	Polyradiculonévrite.Oxygène hyperbare.	84	0,32
48	Méningite	60	0,80
49	Cancer de la prostate:compression médullaire : paraplégie.	70	0,64
50	Méningite purulente à pneumo.	51	1,14
51	Coma : Insuffisance hépatique	69	0,32
52	Méningite chronique lymphocytaire	36 44	1,02 0,96
53	Méningite purulente germe X Purpura nécrotique, hématome sous-dural.	70 24 44	1,20 0,78 0,84

Alors que notre taux moyen normal est de $49 \pm 8 \mu\text{M}/100\text{ml/h}$, nous obtenons comme taux moyen de ces observations $82 \pm 7 \mu\text{M}/100\text{ml/h}$. Il apparaît donc une différence très significative entre ces deux chiffres.

Le problème de l'influence de la thérapeutique serait intéressant à approfondir. Nous n'aborderons ce sujet qu'en ce qui concerne les malades présentant une maladie de Parkinson.

--*--

III . 3 . L'ACHÉ ET QUELQUES SYNDROMES :

Afin d'essayer de dégager des variations pathologiques significatives , nous allons analyser les résultats obtenus dans un certain nombre de syndromes bien individualisés.

III . 3 . 1 . L'ACHÉ DANS LA S.E.P.

Cette affection qui est une des plus étudiées va faire apparaître là encore, un certain nombre de contradictions dans les données de la littérature. Jefferson (1954)-088-, Bernsohn (1958)-024- et Svensmark (1958) -202- qui ont effectué des dosages sur les L.C.R. de 14,15 et 24 malades présentant une S.E.P. trouvent respectivement, par la méthode d'Ammon, les moyennes de 60,74, et 25 $\mu\text{M}/100\text{ml/h}$ d'activité AChéstérasique. Ajoutons la valeur de 119 $\mu\text{M}/100\text{ml/h}$ publiée par Johnson en 1971 et nous pourrions accueillir avec toute la réserve nécessaire la conclusion pour le moins hâtive de Schuller (1967)-166- qui affirme que l'activité AChéstérasique est diminuée au niveau du L.C.R. chez les malades atteints de S.E.P. . Une telle dispersion des résultats ajoutée à la variabilité des valeurs prétendues normales ne saurait permettre de tirer une conclusion.

Nous avons, quant à nous, retenu que trois observations répondant au diagnostic de S.E.P., tenant à écarter toutes celles pour lesquelles le moindre doute clinique pouvait subsister.

Pour ces trois malades nous avons obtenu des taux d'activité dans le L.C.R. de 62,14 et 56. Si malgré cette

dispersion nous calculons le taux moyen, il est de $44 \mu\text{M}/100 \text{ ml/h} \pm 15$. Celui-ci ne s'écarte donc guère de notre taux moyen témoin, mais il existe un écart individuel relativement important. Il serait souhaitable de pouvoir effectuer des dosages au cours des poussées et au cours des rémissions, mais il faut rappeler qu'une ponction lombaire est souvent assez mal supportée par ces malades et qu'elle n'est pas indispensable lorsque le diagnostic est fait. Svensmark qui aurait effectué des dosages sur les L.C.R. de 4 malades en rémission et de 20 en poussée évolutive trouvait des taux inférieurs chez ceux qui étaient en rémission.

Pour conclure, trouvant un taux moyen de $44 \mu\text{M}/100 \text{ ml/h} \pm 15$ chez les sujets atteints de S.E.P. pour 49 ± 8 chez nos témoins, nous pensons que ce taux est approximativement normal avec cependant des variations individuelles plus importantes. Il n'est pas exclu que les différentes formes de S.E.P. aboutissent à des taux différents en fonction de la localisation des atteintes. En outre il s'agit d'une maladie dont la thérapeutique est souvent complexe et contrariée par des intolérances personnelles importantes. Nous pensons que tous ces facteurs interviennent et feraient à eux seuls l'objet d'un chapitre intéressant si le problème humain ne dominait pas cette question d'une façon beaucoup plus aiguë que dans d'autres maladies.

III . 3 . 2 . L'ACHÉ DANS LES MENINGITES

Johnson apporte trois dosages d'ACHé dans les L.C.R. de sujets atteints de méningite donnant un taux moyen de $138 \mu\text{M}/100 \text{ ml/h} \pm 66$: d'une part ce chiffre n'est pas significativement différent de celui qu'il trouve pour ses "normaux"

(et nous avons vu qu'ils étaient à considérer avec réserve)
d'autre part la dispersion de ses résultats est relativement importante.

Nous n'avons retenu que quatre observations de méningite (n°47-49-51-52) qui ne présentaient aucune difficulté diagnostique. Ces quatre dosages ont donné un taux moyen de $54 \mu\text{M}/100\text{ml/h} \pm 7$, là encore non significativement différent du taux normal. A noter que la dispersion de nos résultats est relativement faible.

Nous pensons que ceci s'explique logiquement par le fait que l'inflammation respecte presque totalement le tissu nerveux puisqu'aucun signe d'encéphalite n'était noté au niveau des observations .

III . 3 . 3 . L'ACHE ET LES PROCESSUS NEOPLASIQUES

Dans ce domaine également, les données de la littérature ne nous ont pas semblées satisfaisantes. Jefferson possède huit observations de tumeurs cérébrales et quatre de tumeurs médullaires mais les dosages s'y rapportant n'ont pas été publiés. Nous n'avons donc comme référence qu'un seul dosage dans un processus tumoral non étiqueté qui donne un taux de $134 \mu\text{M}/100\text{ml/h}$. Le taux considéré comme normal par Jefferson étant de 105 ± 24 , il semble que l'on puisse admettre là une augmentation de l'activité enzymatique au niveau du L.C.R..

Jefferson rapporte également l'observation d'un neurinome acoustique pour lequel il trouve un taux du même ordre. Le plus intéressant, semble-t-il bien qu'inexpliquable dans l'état actuel des connaissances est le dosage effectué au ni-

veau du L.C.R. d'un malade présentant un épéndice dymome donnant une activité de 21 $\mu\text{M}/100\text{ml/h}$. Ceci est intéressant pour deux raisons: tout d'abord ce taux est significativement différent de tous les autres résultats présentés par cet auteur, ensuite le tissu épéndiceymaire est situé au contact même du L.C.R. et intervient lors de sa formation comme lors de sa résorption. Nous regrettons beaucoup que cet auteur n'ait donné aucun renseignement clinique concernant la taille et surtout la localisation de cette tumeur, l'interprétation de ce résultat étant de ce fait plus que difficile.

Dans nos observations figurent plusieurs malades présentant des processus tumoraux d'origines diverses. Si, à partir des dosages réalisés sur les L.C.R. correspondant aux malades dont les observations portent les numéros 7,36,38,39 40,41,42,43,44, et pour lesquels nous avons respectivement obtenus les chiffres suivants: 142,100,97,78,135,27,37,122,146 $\mu\text{M}/100\text{ml/h}$, nous effectuons sans discrimination une moyenne, nous obtenons $98 \pm 10 \mu\text{M}/100\text{ml/h}$.

Ce résultat permet de constater déjà que dans les tumeurs d'origine variée on obtient un taux qui est double de celui observé chez les témoins. Si nous considérons les résultats de plus près, nous constatons que deux chiffres diffèrent de façon importante: En reprenant les observations on constate que le L.C.R. ayant un taux d'activité de 27 $\mu\text{M}/100\text{ml/h}$ a été soumis à une radiothérapie, de même que celui qui a un taux d'activité de 37 $\mu\text{M}/100\text{ml/h}$. Cette dernière malade présentant des métastases multiples de cancer du sein. Si l'on refait donc une moyenne en excluant ces deux dosages (car il est normal, en effet, que la métabolisme de l'ACHÉ suive le ralentissement métabolique général entraîné par une

radiothérapie importante), nous trouvons alors une valeur de $117 \pm 8 \mu\text{M}/100\text{ml/h}$.

Parmi ces sept observations quatre concernent des malades porteurs d'un glioblastome, dont la moyenne des trois non soumis à une radiothérapie donne un taux moyen d'activité très élevé puisqu'il est de deux fois et demi le taux normal soit $126 \mu\text{M}/100\text{ml/h} \pm 6$.

Pour expliquer cette augmentation de l'activité, deux hypothèses nous semblent possibles. Nous les exprimons cependant sous toutes réserves car beaucoup de facteurs restent inconnus: elle peut être due soit à une modification de la perméabilité entre le tissu nerveux et le L.C.R., soit à un apport supplémentaire d'AChE déversée dans le L.C.R., par une réaction du tissu neuronal normal ou par la sécrétion exacerbée au niveau du tissu néoplasique; les cellules qui constituent ce tissu sont normalement pauvres en AChE mais rien n'exclut que cette activité métabolique, comme d'autres probablement, soit exacerbée lors du développement du processus néoplasique.

III . 3 . 4 L'ACHÉ DANS LES EPILEPSIES :

En ce qui concerne l'épilepsie, les apports de la littérature sont relativement importants. Kalsbeck rapporte un cas pour lequel il trouve $132 \mu\text{M}/100\text{ml/h}$, Bernsohn rapporte 20 observations pour lesquelles il a un taux moyen de $65 \mu\text{M}/100\text{ml/h}$, Svensmark présente 10 malades dont le taux moyen d'activité dans le L.C.R. est de $45 \mu\text{M}/100\text{ml/h}$.

Dès l'abord de cette question, il est évident que les problèmes d'interprétation sont analogues à ceux rencontrés

lors de l'étude de la S.E.P. : Multiplicité d'origine, de localisation et diversité des résultats. En ce qui nous concerne, nous avons retenu deux comitialités parmi nos observations.

L'observation n° 28 décrit une comitialité tardive d'origine inconnue et pour laquelle nous obtenons un chiffre normal. L'autre observation est également celle d'une comitialité dont le tableau clinique fait évoquer une comitialité temporelle et là encore l'origine en est actuellement inconnue: deux ponctions lombaires effectuées chez cette malade montrent non seulement une protéinorachie relativement importante puisque de 2,60 g et 2,10 g mais une activité AChE très élevée égale à 142 et 124 $\mu\text{M}/100\text{ml}/\text{h}$, valeurs comparables. Nous rappelons que le taux d'activité enzymatique n'est aucunement influencé par le taux des protéines intrarachidiennes contrairement à d'autres enzymes comme la choline acétylase. (Johnson- 1971) Il ne nous paraît donc pas invraisemblable, vu cette activité élevée, que cette épilepsie se révèle un jour, comme étant d'origine néoplasique, et bien que ce ne soit là qu'une hypothèse, nous nous interdisons de conclure sur le taux rencontré chez les épileptiques.

III . 3 . 5 . L'ACHE DANS QUELQUES OBSERVATIONS PARTICULIERES

Avant d'aborder l'important problème des rapports de l'AChE et du traitement de la maladie de Parkinson, nous voudrions relever quelques observations diverses dont les résultats nous ont semblé intéressants. Un malade présentant un hématome sous-dural bilatéral avec paralysie de fonction présente une activité de 46 $\mu\text{M}/100\text{ml}/\text{h}$ que l'on peut donc considérer comme normal. Un second malade avec hématome sous-

dural présentait un taux d'activité identique. Nous pensons que ceci est à rapprocher des résultats observés dans les méningites.

Il nous a semblé intéressant également de noter qu'un malade qui est entré en se plaignant d'une lumbago-sciatalgie et qui a été reconnu pithiatique présente un taux très bas de $18 \mu\text{M}/100\text{ml/h}$. Un second malade avec un léger trouble du comportement sans être véritablement pithiatique, et dont l'examen neurologique s'était avéré parfaitement normal, se plaignait de malaises avec perte de connaissance dont personne n'était témoin. Ce malade a un taux égal à la moitié du taux normal. Nous avons été tenté de considérer ces deux malades comme des témoins. Nous leur avons préféré les sujets venant pour bilan de sommeil car ils étaient en fait les seuls exempts de toute thérapeutique. Il n'est pas impossible que les taux bas de ces deux malades soient dus aux drogues administrées ou prises spontanément, et la circonspection nous a semblé de rigueur.

Nous relèverons une dernière observation pour laquelle nous obtenons un taux normal : il s'agit d'une S.L.A.

--*--
*

III . 4 . L'ACHE DANS LA MALADIE DE PARKINSON:

Dans cette partie, nous allons tenter à partir d'une entité clinique connue et facilement identifiable (ce qui exclut toute modification ultérieure du diagnostic) de faire la part entre le rôle que joue le processus morbide lui-même et celui que joue la thérapeutique. Etant donné les variations individuelles vis-à-vis du traitement, les intolérances conduisant parfois à un arrêt de celui-ci, il nous a semblé intéressant de ne travailler que sur des moyennes portant sur un nombre d'échantillons suffisamment grand. Ceci nous a permis de façon valable de comparer un certain nombre d'éléments.

III . 4 . 1 . LES OBSERVATIONS :

Nous ne résumerons pas ici ces 42 observations qui exposent toutes le cas de malades chroniques connus, présentant un syndrome classique de Parkinson. Tous ces malades étaient au moment de la première ponction lombaire, qui fut la seule pour certains, sous anti-parkinsonien de type Artane. Dans tous les cas cette thérapeutique antérieure à la première ponction fut continuée, mais en outre un certain nombre de ces malades furent soumis à la L.DOPA à un taux très progressif pendant une douzaine de jours pour aboutir à un taux maximum de 5g par jour. Ces malades, soumis à cette double thérapeutique, subirent deux autres ponctions lombaires : une dix jours après le début du traitement, la dernière un mois. Sur ces prélèvements ont été effectués les dosages suivants:

- 5 HIA* qui est restée stable d'une façon générale.
- HVA* qui a subi une élévation, ce qui semble logique.

* Ces dosages ont été effectués par Monsieur P. QUENIN

- Les protéines qui sont en moyenne un peu diminuées sans que cela soit très significatif.
- Enfin l'AChE (qui n'a pas toujours pu être dosé sur tous les prélèvements).

Nous avons tout d'abord constaté que ces parkinsoniens connus et traités par des anticholinergiques de type Artane présentaient tous (à une seule exception près) une activité acétylcholinestérasique élevée dans le L.C.R. En effet nous obtenons un taux moyen de 105 $\mu\text{M}/100\text{ml/h}$ supérieur à deux fois notre taux normal.

Il est peut-être bon de noter déjà que les structures cérébrales, touchées dans ce syndrome sont proches du L.C.R. et présentent une exceptionnelle richesse en AChE. Ceci sans ignorer l'influence surajoutée de la thérapeutique sur ces structures.

De fait les résultats portant sur la seconde ponction lombaire (donc après 10 jours de traitement à la L.DOPA) montrent une diminution légère mais significative avec un taux moyen de 87 $\mu\text{M}/100\text{ml/h}$; ceci étant confirmé par les dosages sur la dernière ponction lombaire, (donc après un mois de traitement à la L.DOPA) donnant une activité moyenne de 66 $\mu\text{M}/100\text{ml/h}$.

Nous reproduisons ici, schématiquement les résultats biologiques:

N°	AChE en $\mu\text{M}/100\text{ml/h}$			Protéines en g/l			HVA			5HIA		
	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°
54	165			0,45								
55	229			0,40								
56	64			0,35								
57	-	92	-	-	0,18	-	5	10	-	20	20	-

N°	AChE en $\mu\text{M}/100\text{ml/h}$			Protéines:g/l			HVA			5HIA		
	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°
58	71	79	-	-	-	-	35	45	-	20	20	-
59	93	-	-	-	-	-	80	-	-	-	-	-
60	68	48	-	0,56	0,48	-	60	80	-	25	25	-
61	154	-	72	-	-	0,36	40	-	-	25	-	-
62	106	90	-	-	0,18	-	35	60	-	20	20	-
63	23	-	-	-	0,48	-	40	-	-	25	-	-
64	72	-	-	0,76	-	-	20	-	-	25	-	-
65	123	88	-	-	0,35	-	-	80	-	-	30	-
66	67	-	101	-	-	-	-	-	-	-	-	-
67	77	-	60	0,20	-	0,26	45	50	125	25	20	20
68	83	76	56	0,29	-	0,28	60	70	95	25	24	20
69	-	-	69	0,37	0,24	0,30	60	90	130	20	20	15
70	-	94	18	-	-	-	35	60	95	25	25	20
71	-	71	-	0,69	0,46	0,75	-	15	85	-	20	20
72	135	-	-	0,55	-	-	45	-	-	-	-	-
73	261	-	-	0,46	0,33	-	45	60	-	25	20	-
74	44	116	44	0,21	0,22	0,22	55	55	80	20	20	20
75	-	-	67	0,55	0,25	0,23	20	40	90	20	15	20
76	90	-	-	-	-	-	45	-	-	25	-	-
77	101	160	99	0,56	0,53	-	55	60	60	25	23	25
78	-	98	47	0,59	-	0,33	60	65	100	-	25	25
79	91	-	-	0,41	-	-	90	-	-	20	-	-
80	136	122	-	0,41	0,45	0,40	40	45	50	20	18	20
81	52	-	67	0,25	0,30	0,26	55	60	80	15	15	15
82	-	118	-	0,36	0,52	-	90	100	-	25	22	-
83	115	210	40	0,20	-	0,21	50	55	130	20	20	20
84	-	-	125	0,30	0,32	0,26	60	70	60	20	20	18
85	125	-	27	-	-	0,16	80	80	85	20	20	28
86	145	34	82	0,90	0,42	0,43	45	50	150	20	16	20
87	74	63	71	0,54	0,60	0,47	50	55	65	25	25	25
88	128	38	-	-	0,29	-	54	70	-	7	7	-
89	219	95	-	0,43	0,59	-	5	55	-	5	5	-
90	56	-	60	0,49	-	0,35	60	70	110	20	17	20
91	78	58	-	0,51	0,60	-	14	90	95	15	15	15
92	55	82	95	0,64	0,66	0,32	80	85	85	22	20	20
93	-	110	65	-	0,29	0,22	45	60	80	25	20	30
94	152	-	40	-	-	-	50	70	50	25	25	25
95	23	53	59	0,46	0,85	0,21	3	50	120	30	25	25
96	51	-	-	0,44	-	-	-	-	-	-	-	-
moyenne:	105	87	66	0,54	0,39	0,32	47	61	91	21	19	21

III . 4 . 2 . DISCUSSION :

Il ne semble tout d'abord pas que cette tendance à la normalisation corresponde simplement à une amélioration clinique.

Nous avions au départ affaire à des malades dont le traitement était constitué pour une grande part de produits de la lignée de l'Artane; selon Kato et coll.(1970) -100- cette drogue qui est un atropino-mimétique se fixerait sur le site anionique de l'AChE.

Il n'est pas interdit d'émettre l'hypothèse que l'activité anti-cholinestérasique de cette substance entraîne une élévation de la teneur en enzyme du L.C.R. soit par élimination de l'enzyme passagèrement inactivée, soit par une libération accrue d'AChE nouvellement synthétisée et éliminée dans le L.C.R., la membrane étant occupée par l'enzyme bloquée

Pour clarifier cette influence de la thérapeutique sur l'activité enzymatique nous avons jugé utile de procéder à une expérimentation animale:

- Afin de retrouver l'élévation d'activité, parallèlement à un lot de témoins, nous avons soumis un lot de rats à un traitement prolongé à l'Artane.
- Un autre lot de rats a été soumis à la L.DOPA seule.
- Un troisième lot a été soumis à l'action combinée de ces deux drogues de façon à observer leur éventuelle interaction.

III . 4 . 3 . EXPERIMENTATION CHEZ L'ANIMAL :

La reproduction expérimentale de la maladie de

Parkinson semblant loin d'être satisfaisante sur le plan biologique, nous n'avons pas jugé utile d'opérer des rats à cette fin.

Nous nous sommes adressé à des rats mâles de race Wistar. Nous devons signaler ici, que nous espérions lors de cette expérience non seulement faire des dosages sur les différentes structures encéphaliques mais aussi sur les L.C.R. . Pour cela, dans chaque groupe de 10 nous avons pris 5 rats auxquels nous avons implanté des canules intra-ventriculaires fermées par un mandrin. Malheureusement malgré toutes les précautions prises tous les rats ont réussi à arracher canules et système de protection plastique avant la fin de notre expérimentation. Celle-ci s'est poursuivie pendant 45 jours.

Les rats ont été repartis en lots de 10 selon le protocole suivant:

- Lot I : 10 rats témoins
- Lot II : 10 rats sous Artane : 30 µg/j pendant 45 jours
- Lot III : 10 rats sous Artane : 30 µg/j pendant 45 jours et du 15° au 45° jour L.DOPA à dose croissante similaire au traitement du Lot IV.
- Lot IV : 10 rats sous L.DOPA :
 - 1° et 2° jour : 1,5 mg/j
 - 3° " 4° " : 3 "
 - 5° " 6° " : 4,5 "
 - 7° " 8° " : 6 "
 - 9° " 10° " : 7,5 "
 - 11° " 12° " : 9 "
 - 13° " 14° " : 10,5 "
 - 15° " 16° " : 13 "
 - 17° " 18° " : 14,5 "
 - 19° " et les jours suivants jusqu'au 30° jour : 15 mg/j
- Lot V : 10 rats sous Artane : 30 µg/j pendant 15 jours puis L DOPA aux mêmes doses croissantes, et Amantadine à la dose de 50 µg/j.

NB-Nos doses ont été calculées par simple rapport de poids

avec l'homme (tous nos rats étant de poids similaire) et administrées selon le schéma thérapeutique appliqué aux malades considérés.

Les problèmes d'administration ont été résolus par l'inclusion d'Artane pilé, d'Amantadine et de L.DÔPA dans du chocolat fondu à température modérée de façon à ne pas altérer les drogues. Nos rats ayant été très vite conditionnés, nous avons pu très facilement administrer à chaque rat la dose qui lui était impartie même lors de prises successives de plusieurs médicaments.

Nous avons noté dans l'ensemble une très bonne tolérance. Cependant quelques rats, bien qu'acceptant leur nourriture, ont semblé pendant quelques jours nauséux. Par ailleurs un animal a présenté pendant trois jours, des hallucinations suivies par des signes de déséquilibre. (Il n'est pas exclu que ces signes soient à rattacher à une infection, ce rat étant porteur de canule intra-ventriculaire.)

Au 45^e jour, les rats sont sacrifiés par décapitation sans l'intermédiaire d'anesthésique. La dissection de l'encéphale est immédiatement réalisée selon la méthode de Glowinsky (1966) -O79- et les différents fragments sont placés rapidement au congélateur à -18°. Dans un second temps, toutes ces structures sont pesées, homogénéisées, mises en suspension à raison de 1g de tissu par ml de solution de saccharose 0,25 N, et immédiatement replacées dans le congélateur. Les dosages d'ACHé sur ces différentes structures ont été réalisés ultérieurement en parallèle à un bilan complet des catécholamines.

Ces derniers résultats se sont avérés sans surprise.

III . 4 . 4 . NOS RESULTATS :

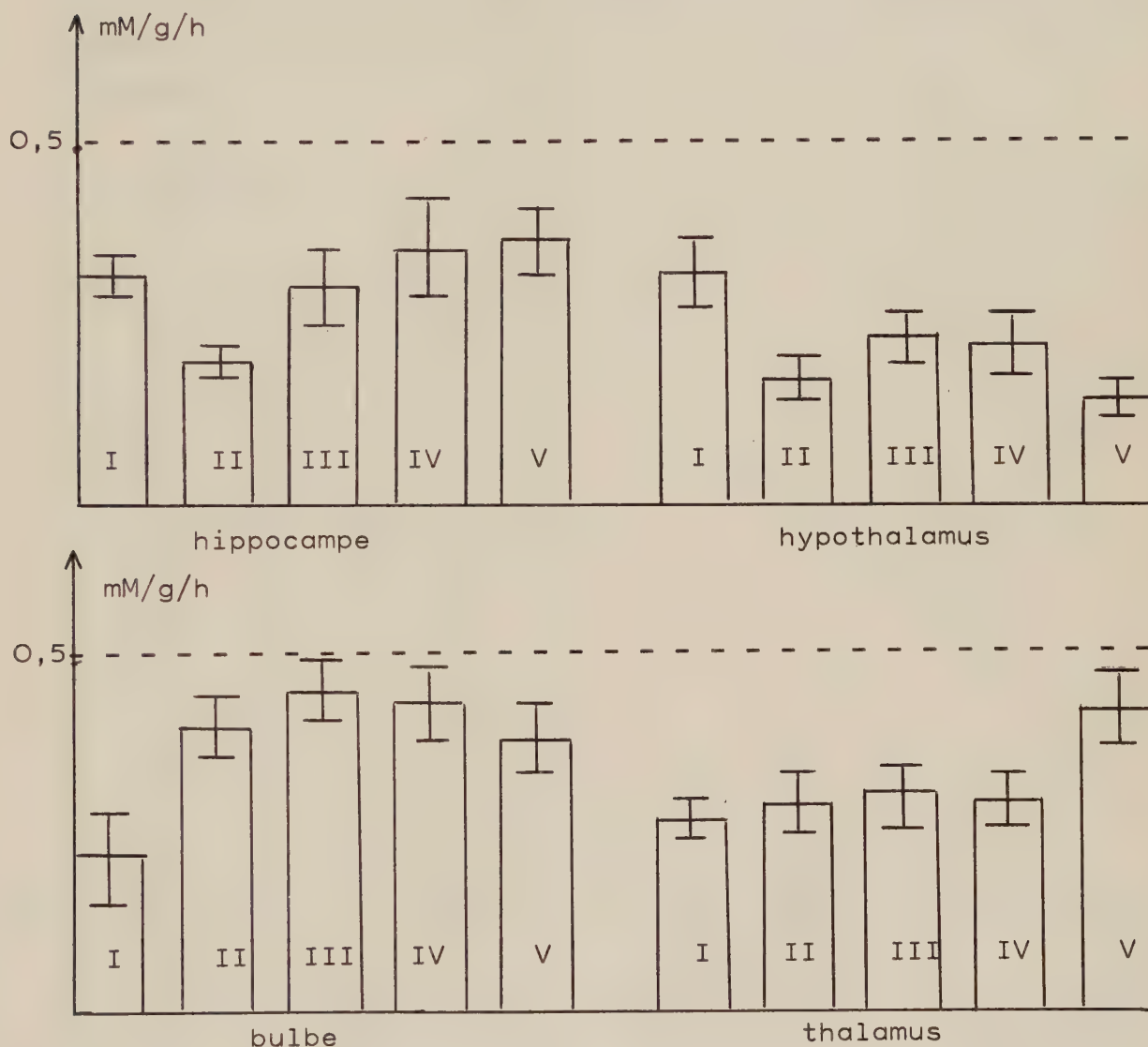
Nous avons tout d'abord comparé les résultats trouvés chez les témoins avec les dosages antérieurs effectués lors d'essais préliminaires. Bien que la dissection anatomique soit différente, nous trouvons dans l'ensemble des résultats comparables ; il apparaît cependant que le taux maximum au niveau du noyau caudé est un peu inférieur mais ceci s'explique par la différence d'âge des animaux, ce facteur de variation ayant été décrit dans la littérature. Cette corrélation étant satisfaisante, nous allons comparer les valeurs du lot témoin à celles obtenues après différents traitements. Les variations étant, dans certains cas, faibles, nous avons dû, pour ce faire, utiliser largement les techniques statistiques et en particulier le "test de t" pour savoir ce qui était ou non significatif.

Nous rapporterons nos résultats en trois étapes : Les résultats du cortex et du cervelet, ceux de diverses structures, et enfin ceux du noyau caudé et du mésencéphale.

A niveau des aires corticales ainsi qu'au niveau du cervelet, les taux sont relativement bas et les dosages ne donnent aucune différence significative entre les lots soumis aux différents traitements et comparativement au lot témoin.

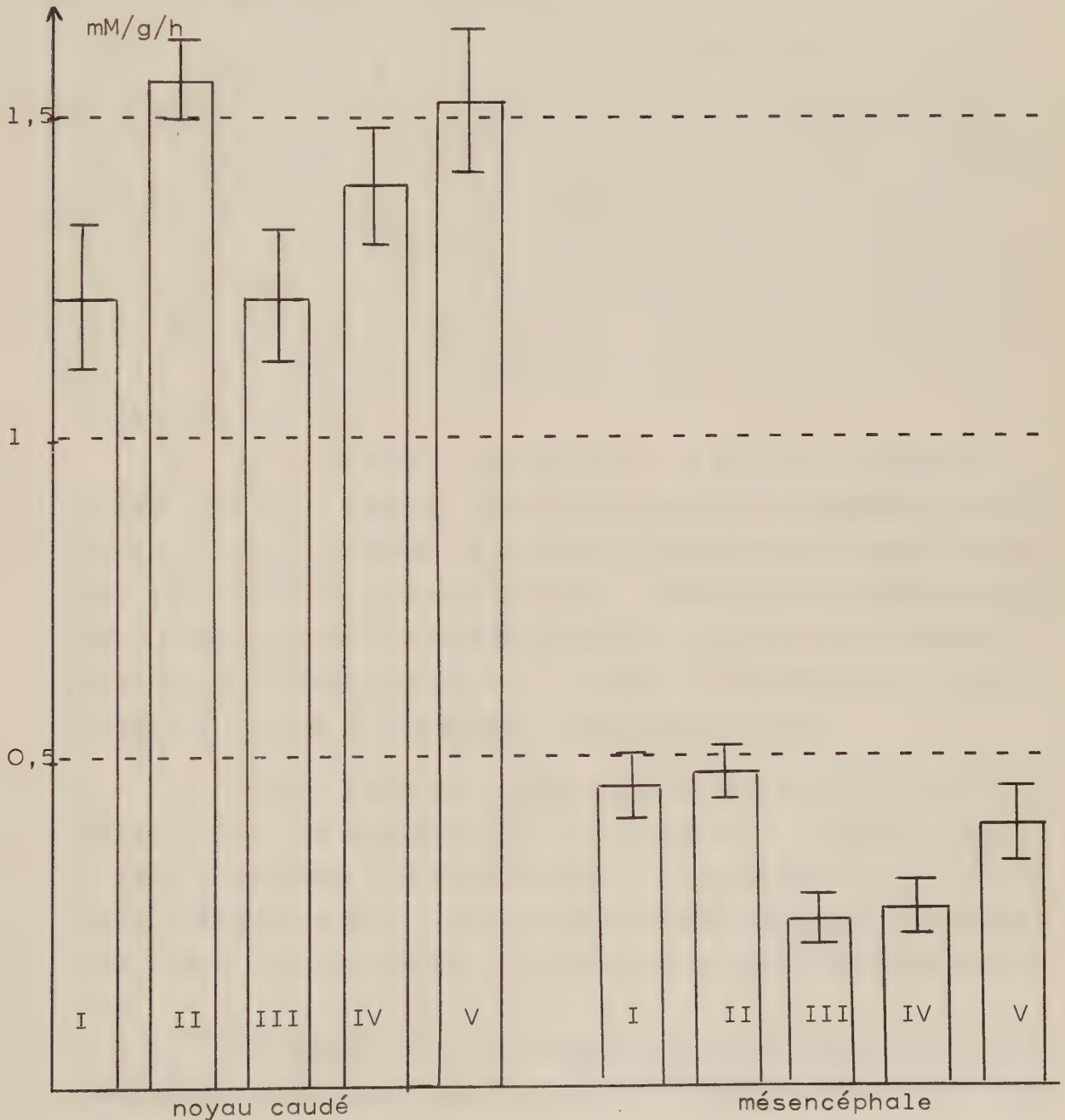


Au niveau des 4 structures encéphaliques suivantes: hippocampe, hypothalamus, thalamus, bulbe, les résultats sont très difficilement interprétables.



En fait, ces variations de peu d'importance, et parfois contraires, n'ont certainement aucun retentissement au niveau du L.C.R. d'autant que ces structures présentent comparativement au noyau caudé des quantités d'AChE peu importantes.

Beaucoup plus intéressant est le résultat observé au niveau du noyau caudé. En effet l'activité moyenne de 1229 $\mu\text{M/g/h}$ chez les animaux témoins, passe à 1557 $\mu\text{M/g/h}$ chez les rats soumis à un traitement chronique à l'Artane. Cette augmentation est significative.



En outre l'adjonction de L.DOPA aux doses thérapeutiques entraîne un retour d'activité vers un taux normal au bout de 45 jours : soit 1231 $\mu\text{M/g/h}$.

Il existe une corrélation entre ces résultats et ceux obtenus à partir des L.C.R.

Les deux autres lots de rats montrent d'une part un taux élevé pour celui soumis à la L.DOPA seule mais non significativement différent des témoins, et un taux augmenté pour celui soumis aux trois drogues. Ceci semble permettre de conclure qu'il existe un antagonisme entre l'Artane et la L.DOPA lorsque ces deux substances sont dans un certain rapport, cet antagonisme pouvant être supprimé ou diminué lorsque la L.DOPA devient prépondérante sous l'action de l'Aman-tadine par exemple.

Ces résultats font évoquer la boucle de Poirier (1965) -178- qui établit une liaison entre le système dopaminergique, et le système cholinergique. Ce rapprochement ne doit être fait qu'avec prudence, l'AChE n'étant qu'un reflet éloigné du métabolisme de l'acétylcholine puisque cette enzyme possède sa synthèse propre et n'entre en contact avec le médiateur lui-même qu'au moment de sa destruction.

Il est cependant bien certain que cette boucle intervient lors du traitement de la maladie de Parkinson car, il serait autrement bien difficile d'interpréter le succès thérapeutique de deux types de substances agissant l'une sur le système dopaminergique, l'autre sur le système cholinergique.

En résumé, ayant éliminé une corrélation entre ces variations d'activité enzymatique et l'amélioration de l'état

clinique des malades, étant donné la possibilité que nous venons d'apporter de reconstituer chez des animaux normaux des variations similaires au niveau du noyau caudé, source la plus importante d'enzyme, il nous semble possible de considérer que les modifications d'activité observées chez les 42 malades atteints de maladie de Parkinson ne sont que le reflet de la thérapeutique.

Les résultats obtenus au niveau du mésencéphale donnent des résultats similaires à ceux trouvés pour le noyau caudé mais à des taux moindres.

--*--
*

C O N C L U S I O N S

Dès 1933 Ammon -004- décrivait une méthode permettant de doser l'activité acétylcholinestérasique dans les tissus. Pendant longtemps ce fut la technique la plus précise et ce n'est véritablement qu'avec l'apparition des composés radioactifs qu'un progrès important fut réalisé. Certaines de ces nouvelles méthodes, notamment celle de Mc Caman (1968) -139- ont apporté une grande sensibilité mais sont d'exécution assez délicate et difficilement applicable à de grandes séries. C'est dans ce but que nous avons été conduit à mettre au point une méthode, qui, tout en gardant cette précision, n'exige qu'une manipulation simple.

Cette méthode basée sur la fixation sélective de l'acétate libéré sur résine anionique devrait pouvoir permettre une exploration systématique des variations de l'enzyme en pathologie humaine, la confusion qui règne dans la littérature nous en ayant souligné la nécessité. Nous l'avons appliquée à des déterminations d'activité au niveau du L.C.R. : d'une part, chez des sujets témoins, sans thérapeutique, ce qui nous a permis de définir un taux considéré comme normal, d'autre part chez des malades hospitalisés pour différents syndromes.

Nous avons observé des taux pratiquement normaux dans les cas de sclérose en plaques, de sclérose latérale amyotrophique, d'hématomes sous-duraux, de méningites; des taux élevés chez les malades souffrant de tumeurs cérébrales, particulièrement dans les glioblastomes.

Chez les malades atteints de maladie de Parkinson, nous avons observé une activité élevée sous traitement à l'Artane et une normalisation avec l'administration simultanée de

L.DOPA. Ayant reproduit ces traitements chez des rats normaux, nous avons retrouvé des variations similaires au niveau du noyau caudé, source importante d'enzyme. Dans ce syndrome, il semble donc que les variations de l'activité enzymatique soient un reflet de la thérapeutique.

Ce n'est là qu'une modeste contribution à l'étude de l'AChE en pathologie humaine mais nous souhaitons que notre méthode de dosage puisse être utilisée de façon relativement systématique pour qu'ultérieurement une étude statistique soit en mesure de mettre en évidence des corrélations significatives entre la clinique et le taux de l'enzyme.

--*--
*

B I B L I O G R A P H I E

- 001 AARSETH P. BARSTAD J.A.B.
Blood-brain-barrier permeability in various parts of the
central nervous system.
Arch.Int.Pharmacodyn. 1968 176:434-442
- 002 ALDRIDGE W.N.
Some properties of specific ChE with particular referen-
ce to the mechanism of inhibition by D.F.P.and analogues.
Biochem J. 1950 46:451-460
- 003 ALDRIDGE W.N. JOHNSON M.K.
Cholinesterase,succinic deshydrogenase ,nucleic acids es-
terase and glutathione reductase in sub-cellular fractions
from rat brain .
Biochem.J. 1959 73:270-277
- 004 AMMON R.
Die Fermentative Spaltung des Acetylcholins .
Pflügers Arch.ges.Physiol. 1933 233:486-491
- 005 APRISON M.H. HIMWICH H.E.
Relationship between age and the ChE activity in several
rabbit brain areas .
Am.J.Physiol. 1954 179:502-506
- 006 AUGUSTINSSON K.B.
Cholinesterases .
Nature (London) 1948 162:194-195
- 007 AUGUSTINSSON K.B.
ChE : A study in comparative enzymology .
Acta Pysiol.scand. 1948 15(suppl 52) : 1-182
- 008 AUGUSTINSSON K.B.
Classification and comparative enzymology of the ChE and
methods for their determination . In : "Handbuch der Expe-
rimentallen Pharmakology" vol XV chap4:89-128 1963
- 009 AUGUSTINSSON K.B.
The nature of an "anionic"site in butyrylcholinesterase
compared with that of a similar site in AChE .

Biochim. Biophys. Acta 1966 128:351-362

O10 AUGUSTINSSON K.B.

Determination of activity of cholinesterases.

Meth.Biochem.Anal. suppl. 1971 217-273

O11 AZMITIA E.C. ALGERI S. COSTA E.

Amantadine-Dopamine interaction possible ,mode of action
in Parkinsonism.

Science 1970 169:203-204

O12 BAJGAR J. URBAN R.

AChE activity in various parts of the rat brain .

Sb.Ved.Pr.Lek.Fak.Karlovy Univ. 1970 13(suppl 2):219

O13 BAJGAR J. PATOCKA J. ORNST F. ZIZKOVSKY V.

Subcellular distribution of AChE activity in human brain
caudate nucleus .

J.Neurochem. 1971 18:529-530

O14 BARNARD E.A. WIECKOWSKI J.

Measurment of AChE molecules at motor endplates and their
correlation with impulse transmission .

3°int.Congr.histochem.cyto.sum.rep.N.Y. 1968 :16-17

O15 BARRON K.D. BERNSOHN J.

Esterases of developing human brain .

J.Neurochem. 1968 15:273-284

O16 BAUM G.

Determination of AChE by an organic substrate selective
electrode .

Anal.Biochem. 1971 39:65-72

O17 BECKETT A.H. HARPER M.J. CLITHEROW J.W.

The absolute configuration of the α and β methylcholine
isomers and their acetyl and succinyl esters.

J.Pharm.Pharmacol. 1963 15:349-361

O18 BECKETT A.H. KIRK G. VIRJI A.S.

Micelles as simple models of drug receptors .

J.Pharm.Pharmacol. 1967 19 :827-836

- O19 BELLEAU B.
An analysis of drug-receptor interactions .
Proc.1st Int.Pharmacol.Meet. 1963 7:75-95
- O20 BENNETT E.L. DIAMOND M.C. MORIMOTO H. HEBERT M.
AChE activity and weight measures in fifteen brain areas
from six lines rat brain .
J.Neurochem. 1966 13:563-572
- O21 BENNETT E.L. KRECH D. ROSENZWEIG M.R. KARLSSON H.
ChE and lactic dehydrogenase activity in the rat brain.
J.Neurochem. 1958 3:153-160
- O22 BENNETT E.L. ROSENZWEIG M.R. KRECH D. KARLSSON H.
Individual , strain and age differences in cholinesterase
activity of the rat brain .
J.Neurochem. 1958 3:144-152
- O23 BERG S.W. MAICKEL R.P.
A simplified method for determination of brain acetyl -
cholinesterase activity .
Life Sci. G.B. 1968 7:1197-1202
- O24 BERNSOHN J. BARRON K.D. HEDRICK M.T.
Some properties of isoenzymes of brain AChE .
Biochem.Pharmacol. 1963 12:761-764
- O25 BERNSOHN J. BOSHES B. POSSLEY L.
A study of cholinesterase and ali-esterase in various
neurologic diseases .
Neurology 1958 3 :221-226
- O26 BIRKAUSER H.
Cholinesterase in normalen und pathologischen liquor
cerebrospinalis des Menschen .
Schweiz.Arch.Neurol.Psychiat. 1941 46:185
- O27 BIRKHAUSER H.
Cholinesterase and mono-aminoxydase in central nervous
system.

- Schweiz.med.Wschr. 1941 71:750
- O28 BITO L.Z. DAVSON H.
Local variation in cerebro-spinal fluid composition and
its relationship to the composition of the extracellular
fluid of the cortex .
Exp.Neurol. 1966 14:264-280
- O29 BLOOM F.E. BARNETT R.J.
The fine structural localization of ChE in nervous sys-
tem.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 1967 144:626-645
- O30 BONICHON A.
Histochemie de la cholinestérase . Symposium de Bâle.
Bibl.anat. 1961 2:62-72
- O31 BONTING S.L. FEATHERSTONE R.M.
Ultramicroassay of the cholinesterase .
Archs. Biochem.Biophys. 1956 61:89-98
- O32 BRIGHTMAN M.W.
The distribution within the brain of ferritine injected
into cerebrospinal fluid compartments . II Parenchymal
distribution .
Amer.J.Anat . 1965 117:193-220
- O33 BRZIN M.
The localization of AChE in axonal membranes of frog
nerve fibers .
Proc.Nat.Acad.Sci. (Wash) 1966 56:1560-1563
- O34 CALNE D.B. SANDLER M.
L.DOPA and Parkinsonism .
Nature 1970 226 : 21-24
- O35 CAVANAGH J.B. THOMPSON R.H.S. WEBSTER G.R.
The localization of pseudocholinesterase activity in ner-
vous tissue .
Quart.J.Exp.Physiol. 1954 39:185-197
- O36 CHADWICK L.E.

"Cholinesterases and anticholinesterase agents "

Koelle G. Ed. 1963 p.741

- O37 CHANGEUX J.P. LEUZINGER W. HUCHET M.
Specific binding of ACh to AChE in the presence of Eserine.
F.E.B.S.Letters 1968 2:77-80
- O38 CHANGEUX J.P. PODLESKI T.R. WOFSY L.
Affinity labeling of acetylcholine-receptor.
Proc.Natl.Acad.Sci. U.S. 1968 58:2063-2070
- O39 CHRISTIAN S.T. BEASLEY J.G.
Michaelis constants for isolated cholinesterase system.
J.Pharm.Sci.U.S.A. 1968 57:1025-1027
- O40 CLAUSEN A. FOG T.
Changes in enzymatic activities in plaques from patients
with multiple sclerosis .
Acta Neur.Scand.Suppl.10 vol 40 1964
- O41 CLOUET D. WAELSCH H.
In "Regional chemistry" (Kety ,Elkes Ed.)
Pergamon Press Oxford. 1961 p.243
- O42 COHEN J.A. OOSTERBAAN R.A.
In "ChE and anticholinesterase agents " Koelle Ed.
Berlin:Springer-Verlag 1963 p.299 ,302
- O43 COLLING K.G. ROSSITER R.J.
Cholinesterase in cerebro-spinal fluid.
Canad.J.Res. 1959 E27 :327
- O44 COTZIAS G.C. PAPAVALILIOU P.S.
The Parkinsonism and Levodopa.
Clin.Pharmacol.Therap. 1971 12:319-322
- O45 COYLE J.T. SNYDER S.H.
Antiparkinsonian drugs : inhibition of Dopamine uptake
in the corpus striatum as a possible mechanism of action.
Science 1969 166:899-901

- O46 CSILLIK B. JOO F. KASA F.
Pb-thiocholine techniques for the electron histochemical
localization of acetylcholinesterase .
Acta Histochem (Jena) 1966 25:58-70
- O47 CSILLIK B. KNYIHAR E.
Cholinergic mechanisms in the release of catecholamines
from intra-ganglionic inhibitory terminals.
Experientia 1968: 23:948
- O48 CUTLER R.W.P. MURRAY J.E. CORNICK L.R.
Variations in protein permeability in different regions
of the cerebrospinal fluid .
Exp.Neurol. 1970 28:257-265
- O49 DAVIS R.E. AGRANOFF B.W.
Metabolic behaviour of isozymes of acetylcholinesterase.
Nature G.B. 1968 220 :277
- O50 DE IRALDI A.P. DE ROBERTIS E.
The neurotubular system of the axon and the origin of
granulated and non-granulated vesicles in regenerating
nerves .
Z.Zellforsch 1968 87:330-344
- O51 DEL CASTILLO J. KATZ B.
On the localization of acetylcholine receptors .
J.Physiol.(London) 1955 128:157
- O52 DE ROBERTIS E. DE PLAZAS S.F.
AChE and ACh proteolipid receptor : two different compo-
nents of electroplax membranes .
Biochim.Biophys.Acta 1970 210:388-397
- O53 DE ROBERTIS E. DE IRALDI A.P. RODRIGUEZ DE LOREZ ARNAIS
Cholinergic and non cholinergic nerve endings in rat brain
I- Isolation and subcellular distribution of acetylcho-
line and acetylcholinesterase .
J.Neurochem. 1962 9:23-35
- O54 DETTBARN W.D.

- Distinction between action on AChE and on ACh receptor
in axons.
Biochim.Biophys.Acta 1964 79:629-630
- O55 DEWHURST S.A. Mc CAMAN R.E. KAPLAN W.D.
The time course of development of AChE and choline acetyl
transferase in *Drosophila melanogaster* .
Biochem.genet. 1970 4:499-508
- O56 EARLY D.F. HEMHILL R.E. REISS R.E. BRUMMEL E.
Investigation into cholinesterase levels in serum and ce-
rebrospinal fluid of psychiatric patients .
Biochem.J. 1949 45:552
- O57 EDSTROEM R. STEINWALL O.
The blood-barrier brain phenomenon . The relative impor-
tance of permeability and cellular transport mechanisms.
Acta Neurol.Scand. 1961 37:1-21
- O58 EHRENPREIS S.
Possible nature of the cholinergic receptors .
Ann.N.Y.Acad.Sci. 1967 144:720-736
- O59 EHRENPREIS S. FLEISCH J.H. MITTAG T.W.
Approaches to the molecular nature of pharmacological
receptors .
Pharmacol.Rev. 1969 21:131-181
- O60 EHRENPREIS S. MITTAG T.W. PATRICK P.
Radiometric assay of cholinesterases in intact tissues
in the nanomolar concentration range of acetylcholine.
Biochem.Pharmacol. 1970 19:2165-2169
- O61 ELLMAN G.L. COURTNEY K.D. ANDRES V. FEATHERSTONE J.
A new and rapid colorimetric determination of acetylcho-
linesterase activity.
Biochem. Pharmacol. 1961 7:88-95
- O62 ENGELHARD N. PRCHAL K. NENNER M.
Acetylcholinesterase .
Angew.Chem. G.B. 1967 6:615-626

- O63 FOLDES F.F. ZSGMOND E.K. FOLDES V.M. ERDOS E.G.
The distribution of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the human brain .
J.Neurochem. 1962 9:559-572
- O64 FONNUM F.
Radiochemical microassays for the determination of choline acetyltransferase and AChE activities .
Biochem.J. 1969 115:465-472
- O65 FRIED G.H. ANTROPOL W.
Potentiation of pseudocholinesterase by serotonin and L.S.D.
Federation Proc. 1957 16:357
- O66 FRIEDE R.L. ARBOR A.
Enzyme histochemical studies in multiple sclerosis.
Archives of Neurology 1961 5:433-443
- O67 FUKUDA T. KOELLE G.B.
The cytological localization of intra-cellular neuronal acetylcholinesterase .
J.Biophys.Biochem.Cytol. 1959 5:433
- O68 GABALLAH S.
A direct radioisotopic microassay for cholinesterase.
Proc.Soc.Exper.Biol.Med.USA. 1968 129:370-380
- O69 GAGE J.C. LITCHFIELD D.M.
An automated determination of cholinesterase in micro-samples and in low activity media .
European Technicon Symposium 1966 Paris
- O70 GAL E.M. ROTH E.
Spectrophotometric methods for determination of cholinesterase activity .
Clin.Chim.Acta 1957 2:316-326
- O71 GEREBTZOFF M.A.
"Cholinesterases" 1959 Pergamon Press Oxford

- O72 GIACOBINI E.
The distribution and localization of ChE in nerve cells.
Acta Physiol.Scand. 1959 45(suppl 156) :1-45
- O73 GIACOBINI E.F.
The intracellular localization of ChE .
J.Histochem.Cytochem. 1960 8:419-424
- O74 GIACOBINI E.F.
New microchemical approaches to study the functional activity of individual neurons .
Ann.Acad.Sci.Fenn.Ser. 1968 128:38
- O75 GLASSON B. MUTRUX S.
Contribution à l'étude des ChE dans le L.C.R.
Helv.Physiol.Pharmacol.Acta 1946 4:c14-c16
- O76 GLICK D.
A micromethod for the determination of choline esterase and the activity-pH relationship of this enzyme .
J.Gen.Physiol. 1938 21:289-295
- O77 GLICK D.
Methods of biochemical analysis vol XV . In "Cholinesterases" 1957 p.17 Interscience Publishers IncNY
- O78 GLOWINSKI J. IVERSEN LL.
Regional studies of catecholamines in the rat brain . I-The disposition of *HNE*HDA et *HDOPA in various regions of the brain .
J.Neurochem. 1966 13:655-669
- O79 HEARON J.Z. BERNHARD S.A. FRIESS S.L. BOTTS D.J.
In "The enzymes " vol I p.50 Ed by Boyer ,Lardy ,Myrback NY :Academic Press Inc . 1959
- O80 HESTRIN S.
The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application .
J.Biol.Chem. 1949 180 :249-261

- O81 HOCHWALD G.M. WALLENSTEIN M.
Exchange of albumin between blood, cerebrospinal fluid and
brain in the cat .
Amer.J.Physiol. 1967 212:1199-1204
- O82 HOCHWALD G.M. WALLENSTEIN M.
Exchange of gamma globulin between blood , cerebrospinal
fluid and brain in the cat .
Exp.Neurol. 1967 19:115-216
- O83 HOCHWALD G.M. WALLENSTEIN M. MATHEWS E.S.
Exchange of proteins between blood and spinal subarach-
noid fluid .
Amer.J.Physiol. 1969 217:348-349
- O84 HOLLUNGER G. NIKLASSON B.
The occurrence of soluble AChE in mammalian brain.
Acta Pharmacol.Toxicol. 1967 25(suppl 4):78
- O85 HOLMSTEDT B. TOSCHI G.
Enzymatic properties of cholinesterases in subcellular
fractions from rat brain .
Acta Physiol.Scand . 1959 47:280-283
- O86 HORNYKIEWICK O.
Dopamine and brain function .
Pharmacol.Rev. 1970 18:925-964
- O87 JACOBOWITZ D.
A method for the demonstration of both acetylcholineste-
rase and catecholamine in the same nerve trunk.
Life Sciences 1965 4:297-303
- O88 JEFFERSON M.
The cholinesterase activity of cerebrospinal fluid .
Clin.Sci. 1954 13:599-605
- O89 JENSEN6HOLM J.
The cholinesterase activity , alone and in presence of
inhibitors ,at low concentrations .
Acta Pharmacol. 1961 18:370-397

- O90 JOHNSON S. DOMINO E.F.
Cholinergic enzymatic activity of cerebrospinal fluid of patients with various neurologic diseases .
Clin.Chim.Acta 1971 35:421-428
- O91 JOO F. SAVAY G. CSILLIK B.
A new modification of the Koelle-Friedenwald method for the histochemical demonstration of cholinesterase activity.
Acta Histochem (Jena) 1969 22:40-45
- O92 KAESER H.E. SANER A.
The effect of tetanus toxin on neuromuscular transmission.
Europ.Neurol. 1970 3:193-205
- O93 KALSBECK F. COHEN J.A. BOVENS B.R.
Cholinesterase in cerebrospinal fluid .
Biochem.Biophys.Acta 1950 5:548
- O94 KARLIN A.
The association of acetylcholinesterase and membrane in subcellular fractions of the electric tissue of electrophorus.
J.Cell.Biol. 1965 25:159-169
- O95 KARLIN A.
Chemical distinctions between AChE and the acetylcholine receptors .
Biochim.Biophys.Acta 1967 139 n°2:358-362
- O96 KARNOVSKY M.G. ROOTS L.
A direct coloring thiocholine methode for cholinesterase.
J.Histochem.Cytochem. 1964 12:219-221
- O97 KASA P.
Acetylcholinesterase transport in the central and peripheral nervous tissue : the role of tubules in the enzyme transport .
Nature (London) 1968 218:1265-1267
- O98 KASA P. CSILLIK B.
Electron microscopic localization of cholinesterase by

- a copper-lead-thiocholine technique .
J.Neurochem. 1966 13:1345-1349
- 099 KASA P. CSILLIK B.
AChE synthesis in cholinergic neurons : electron histo-
chemistry of enzyme translocation .
Histochemie 1968 12:175-183
- 100 KATO G. YUNG J. IHNAT M.
Studies of the interaction of eserine and atropine with
acetylcholinesterase .
Biochem.Biophys.Res.Comm. 1970 40 n°1:15-21
- 101 KAYE G.I. PAPPAS G.D.
Cholinesterase .
J.Microscopie 1965 4:497-501
- 102 KITZ R.J GINSBURG S.
The reaction of acetylcholinesterase with some quater-
nary hydroxy aminophenols .
- 103 KITZ R.J. KREMZNER L.T.
Conformational changes of acetylcholinesterase.
Molec.Pharmacol. 1968 4:104-107
- 104 KOBAYASHI H. URANO A. YOKOYAMA K.
Acetylcholinesterase and MAO in the hypothalamic neuro-
secretory system.
Third Intern.Congr.Histochem.Cytochem.NY. 1968
- 105 KOELLE G.B.
The histochemical differentiation of types of cholines-
terases and their localizations in tissues of the cat.
J.Pharmacol.Expt.Ther. 1950 100:158-179
- 106 KOELLE G.B.
The histochemical localization of cholinesterases in the
central nervous system of the rat .
J.Comp.Neurol. 1954 100:211-224
- 107 KOELLE G.B.

- The histochemical identification of acetylcholinesterase in cholinergic , adrenergic and sensory neurons .
J.Pharmacol. 1955 114:167-184
- 108 KOELLE G.B.
"Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Cholinesterases und anticholinesterase Agents .": Cytological distributions and physiological functions of cholinesterases.
Springer-Verlag ,Berlin 1963 187-298
- 109 KOELLE G.B.
Approaches to the electron microscopic localization of acetylcholinesterase .
Third Intern.Congr.Histochem.Cytochem. NY. 1968
- 110 KOELLE G.B.
Dithiolacetic acid ,a histochemical substrate for AChE with unusual properties .: Abstracts of the European symposium on cytochemistry in electron microscopy.
Roy.Micr.Soc. London 1968 p.27
- 111 KOELLE G.B.
Significance of AChE in central synaptic transmission .
Fed.Proc. 1969 28 n°1 :95-100
- 112 KOELLE G.B. DAVIS R. DEVLIN M.
Acetyl disulfide , and bis-(thioacetoxo)aurate I complex, histochemical substrates of unusual properties with AChE
J.Histochem.Cytochem. 1968 16:12
- 113 KOELLE G.B. DAVIS R. GROMADSKI C.G.
Electron microscopic localization of cholinesterase by means of gold salts .
Ann.NY.Acad.Sci. 1967 144:613-625
- 114 KOELLE G.B. FRIEDENWALD J.S.
Histochemical method for localization of cholinesterase activity .
Proc.Soc.Exp.Biol.Med.NY. 1949 70:617-622
- 115 KOELLE G.B. GROMADZKI C.G.
Comparison of the gold-thiocholine and thiolacetic acid

- methods for the histochemical localization of AChE and ChE .
J.Histochem.Cytochem. 1966 14:443-454
- 116 KOELLE G.B. HORN R.S.
Acetyl disulfide , a major active component in the thiol-acetic acid histochemical method for acetylcholinesterase.
J.Histochem.Cytochem. 1968 16:743
- 117 KOELLE W.A. HOSSAINI K.S.
Histochemical evidence and consequences of the occurrence of isoenzymes of AChE .
J.Histochem.Cytochem. 1970 18:812-819
- 118 KOENIG E.
Synthesis mechanism of the axon . Local axonal synthesis of acetylcholinesterase .
J.Neurochem. 1965 12:343-355
- 119 KOENIG J.F.R. KLIPPER R.A.
"The rat brain " Williams and Wilkins Eds.
Baltimore 1963
- 120 KOMETIANI Z.P. KALANDARISHVILI A.A.
Interrelation of AChE and transport ATPase in rat brain microsomes .
Biofizika 1969 14:213-218
- 121 KRAMER D.N. GAMSON R.M.
Measurement of AChE .
Analytic .Chem. 1958 30:251-254
- 122 KREMZNER L.T. WILSON I.B.
A partial characterization of AChE .
Biochem. 1964 3:1902-1905
- 123 KRINANEK-BURES G.C.
On the inst.colorimetric ultramicroassay of acetylcholinesterase and its use for correlating the enzyme activity with the changes in brain function .
Physiol.Bohemoslova 1968 17(5):472-478

- 124 KRUPKA R.M.
Acetylcholinesterase .
Canad.J.Biochem. 1964 42:677-693
- 125 KRUPKA R.M.
Chemical structure and function of the active center of
acetylcholinesterase .
Biochem. 1966 1988-1997
- 126 LA MOTTA R.V. BABBOTT D. WETSTONE M.J.
The depression of serum cholinesterase activity by a
locally implanted human tumor in the guinea pig.
Cancer Res. 1961 21:749-751
- 127 LANGRALL H.M. JOSEPH C.
Status of the clinical evaluation of levodopa in the
treatment of Parkinson's disease and syndrome.
Clin.Pharmacol.Therap. 1971 12:323-331
- 128 LAPETINA E.G. SOTO E.F. De ROBERTIS E.
Gangliosides and acetylcholinesterase in isolated mem-
branes of the rat-brain cortex .
Biochim.Biophys.Acta 1967 135:33-43
- 129 LAWLER H.C.
Turnover time of acetylcholinesterase.
J.Biol.Chem. 1961 236:2296-2301
- 130 LAWLER H.C.
Purification and properties of an acetylcholinesterase
polymer .
J.Biol.Chem. 1963 238:132-137
- 131 LEUZINGER W.
Structure and function of AChE .
W.Prog.Brain Res. 1969 31:241-245
- 132 LEUZINGER W. BAKER A.L.
Crystallization of acetylcholinesterase .
Science 1967 156:540-541

- 133 LEUZINGER W. BAKER A.L. AUVIN E.
Crystallization , absorption spectre , isoionic point.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 1968 59:620-623
- 134 LEUZINGER W. GOLDBERG M. CAUVIN E.
Molecular properties of AChE .
J.Mol.Biol. 1969 40:365
- 135 LINDERSTROM-LANG GLICK G.
Micromethod for determination of choline esterase activity.
C.R.Trav.Lab.Carlsberg 1938 22:300-306
- 136 LOWRY O.H. ROBERTS N.R. WU M.L. HIXON W.S.
The quantitative histochemistry of brain .
J.Biol.Chem. 1954 207:19-37
- 137 LUBINSKA L. NIEMIERKO S. ODERFELD-NOWAK B. SZWARC L.
Behaviour of acetylcholinesterase in isolated nerve
segments .
J.Neurochem. 1964 11:493-503
- 138 Mc CAMAN R.E.
Species differences in subcellular distribution of choline-
esterase ,5-hydroxytryptophane decarboxylase ,and mono-
amino oxydase in four species .
J.Neurochem. 1965 12:927-935
- 139 Mc CAMAN M.W. TOMEY L.R. Mc CAMAN R.E.
Radiometric assay of acetylcholinesterase activity in
submicrogram amounts of tissue .
Life Sciences 1968 7:233-244
- 140 Mc CAMAN R.E. RODRIGUEZ DE LORES ARNAIZ G. DE ROBERTIS
Species differences in subcellular distribution of choline-
acetylase in the CNS . A study of acetylase , acetyl-
cholineesterase , 5 HTP decarboxylase , and monoamine
oxydase in from species .
J.Neurochem. 1965 12:927-935
- 141 Mc GEER P.L. Mc GEER P.E.

- Cholinergic enzyme systems in Parkinson's disease .
Arch.Neurol. 1971 25:265-268
- 142 Mc NAMARA B.P. MURTHA E.F. BERGNER A.D. ROBINS E.
Studies on the mechanism of DFP and TEPP .
J.Pharmacol.Exptl.Therap. 1954 111:232-240
- 143 MAIN A.R. HASTINGS F.L.
Carbamylation and binding constants for the inhibition
of acetylcholinesterase by physostigmine (eserine).
Science NY 1966 154:400-402
- 144 MAIN A.R. IVERSON F.
Measurement of the affinity and phosphorylation constants
governing irreversible inhibition of ChE by DFP.
Biochem.J. 1966 100:523-531
- 145 MARKHAM C.H.
The choreathetoid movement disorder induced by levodopa.
Clin.Pharmacol.Therap. 1971 12:340-343
- 146 MARTINEZ A.J. RODRIGUEZ C.G.
Demonstration of AChE activity by a new histochemical
method IC 24 .
Trab.inst.Cajal Invest.Biol. 1964 56:27-39
- 147 MASSOULIE J. RIEGER F. BON S.
Relations entre les complexes moléculaires de l'AChE .
C.R.Hebd.Seances.Acad.Sci.(Paris) 1970 270:1837-
1840
- 148 MELLANBY J. WHITTAKER V.P.
The fixation of tetanus toxin by synaptic membrane .
J.Neurochem.G.B. 1968 15:3 205-208
- 149 MENDEL B. MUNDELL D.B. RUDNEY H.
Studies on cholinesterase . III .Specific tests for
cholinesterase and pseudocholinesterase .
Biochem.J. 1943 37:473
- 150 MENDEL B. RUDNEY H.

- Studies on cholinesterase .I. Cholinesterase and pseudo-cholinesterase .
Biochem.J. 1943 37:59
- 151 MICHAELI D.
Immunology of AChE . I:substrate specificity and heat stability of AChE and of AChE-antibody complex.
Immunochemistry 1969 6:101-109
- 152 MICHAELI D.
Immunoenzymology of AChE . II :Effect of antibody on the heat denatured enzyme .
Immunochemistry 1969 6:371-378
- 153 MICHAELSON A.
The subcellular distribution of acetylcholine ,choline acetyltransferase and acetyl cholinesterase in nerve tissue .
Ann.N.Y.Acad.Sci. 1967 144:387-410
- 154 MICHEL H.O. KROP S.
Acetylcholinesterase .
J.Biol.Chem. 1951 190:119
- 155 MILLAR D.B. GRAFIUS M.A.
The subunit molecular weight of acetylcholinesterase.
Febs letters 1970 12:6164
- 156 NACHMANSOHN D.
"Chemical and molecular basis of nerve activity ."
(Academic Press ,N.Y) 1959 28-29
- 157 NACHMANSOHN D.
Actions on axons , and evidence for the role of acetyl choline in axonal conduction . In " Handbuch der experimentellen Pharmakologie . Ed by Koelle G.B. Springer-Verlag , Berlin 1963 701-740
- 158 NACHMANSOHN D.
Chemical control of the permeability cycle in excitable membranes during electrical activity .
Ann.N.Y.Acad.Sci. 1966 137:877-900

- 159 NACHMANSOHN D.
Proteins in bioelectricity : the control of ion movements
across excitable membranes .
Proc.Nat.Acad.Sci. USA 1968 61:1034-1041
- 160 NACHMANSOHN D. ROTHENBERG M.A.
Studies on cholinesterase .
J.Biol.Chem. 1945 158:653
- 161 NAMBAT C. GROB G.
Cholinergic receptor in skeletal muscle .
Ann.N.Y.Acad.Sci. 1968 144:772-802
- 162 NATHAN P. APRISON M.H.
Cholinesterase content and functional activity in central
nervous system.
Biochim.Biophys .Acta 1955 18:150-151
- 163 OKINAKA S. YOSHIKAWA M. MOZAL T. TOYOTA M.
Studies on cholinesterase : on cholinesterase of cerebro-
spinal fluid in various diseases .
Tohoku J. Exper.Med. 1953 58:133
- 164 OKINAKA S. YOSHIKAWA M. UNO M. MURO T. MOSAI T.
Distribution of cholinesterase activity in the human
cerebral cortex .
Amer.J.Phys.Med. 1961 40:135-145
- 165 OLDENDORF W.H. DAVSON H.
Brain extracellular space and the sink action of CSF.
Arch.Neurol. (Chic) 1967 17:196-205
- 166 PAPPENHEIMER J.R. HEISEY S.R. JORDAN E.F. DOWNER J.
Perfusin of the cerebral ventricular system in unanes-
thetized goats .
Amer .J.Physiol. 1962 203:763-774
- 167 PARMAR S.S. SUTTER M.C. NICKERSON M.
Localization and characterization of cholinesterase in
subcellular fractions of rat brain and beef pituitary.
Can.J.Biochem. 1961 39:13335-1345

- 168 PATOCKA J. BAJGAR J.
Isoenzymy esteráz lidské plazmy.
Sbor.Ved.Prac.Lek.Fak.Karlovy Univ. 1969 12:123-131
- 169 PATOCKA J. BAJGAR J.
Some enzymatic properties of human brain AChE .
FEBS.Letters 1969 2:195-196
- 170 PINOTTI O. TANFANI L.
L'acetilcholinesterase nel liquido cefalo-rachidiano.
Riv.Pat.Nerv.Ment. 1939 53:181
- 171 PLETSCHER A. BARTHOLINI G.
Selective rise in brain dopamine by inhibition of extra-
cerebral levodopa decarboxylation.
Clin.Pharmacol.Therap. 1971 12:344-352
- 172 PLUM C.M.
Biochemical studies of composition of CSF in multiple sclerosis .
Inter.J.Neurol. 1961 2:121-148
- 173 PLUM C.M. FOG T.
The cholinesterase activity of cerebrospinal fluid.
Acta Neuro.and Psych.Scand. 1959 34 (suppl 128)
66-71
- 174 PLUM C.M. FOG T.
The cholinesterase activity in multiple sclerosis.
Acta Psych.Neurol.Scand. 1960 35(suppl 148):28
- 175 PODLESKI T.R.
Distinction between the active sites of acetylcholine-
receptor and acetylcholinesterase .
Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A. 1967 58:268-273
- 176 PODLESKI T.R.
Molecular forces acting between ammonium ions and acetyl
choline receptor.
Biochem.Pharmacol. 1969 18:211-225

- 177 PODLESKI T.R. NACHMANSOHN D.
Similarities between active sites of ACh receptor and
AChE tested with quinolinium ions .
Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A. 1966 56:1034-1039
- 178 POIRIER L.J. SOURKES T.L.
Influence of the substantia nigra on the catecholamine
content of the striatum.
Brain 1965 88:181-192
- 179 POTTER L.T.
A radiometric microassay of acetylcholinesterase .
J.Pharm.Exper.Therap. 1967 156:500-506
- 180 POTTER L.T.
Acetylcholine , choline acetyltransferase , and acetyl-
cholinesterase . in "Handbook of neurochemistry" Lajtha
Ed. 1970 vol IV chap.12:263-284
- 181 PRINCE A.K.
Spectrophotometric study of the acetylcholinesterase-
catalyzed hydrolysis of 1-methyl-acetoxyquinolinium
iodides .
Arch.Biochem.Biophys. 1966 113:195-204
- 182 PRINCE A.K.
A sensitive fluorometric procedure for the determination
of small quantities of acetylcholinesterase.
Biochem.Pharm. 1966 15:411-417
- 183 REED D.J. GOTO K. WANG C.H.
A direct radioisotopic assay for acetylcholinesterase.
Anal.Biochem. 1966 16:59-64
- 184 REISS M. HEMPHILL R.E.
Cholinesterase activity in C.S.F.
Nature (London) 1948 161:18
- 185 RESNICK R.H. GRAY S.J. KOCH J.P. TIMBERLAKE W.H.
Serotonin metabolism in paralysis agitans.
Proc.Soc.Exp.Biol.N.Y. 1962 110:77-79

- 186 RIDWAY T.H. MARK H.B.
A polarographic method for following the rates of cholinesterase catalyzed hydrolysis of ACh.
Anal.Biochem. 1965 12:357-366
- 187 ROTHENBERG M.A. NACHMANSOHN D.
Studies on cholinesterase III. Purification of the enzyme from electric tissue by fractional ammonium sulfate precipitation.
J.Biol.Chem. 1947 168:223-231
- 188 SALAFSKY B.
A comparison of several methods for the determination of acetylcholinesterase.
Arch.Int.Pharmacodyn. 1965 154:184-196
- 189 SALPETER M.M.
Fine structural localization of AChE in neuromuscular junctions.
Third Int.Congr.Histochem.Cytochem. N.Y. 1968
- 190 SATO O. BERING E.A.
Extraventricular formation of cerebrospinal fluid.
Brain and Nerve. 1967 19:31-33
- 191 SCHLAEPFER W.W. TORACK R.M.
The ultrastructural localization of cholinesterase activity in the sciatic nerve of the rat.
J.Histochem.Cytochem. 1965 14:369-378
- 192 SCHULLER E.
Perspectives actuelles des recherches biochimiques dans la sclerose en plaques.
Presse medicale 1963 26:1470-1472 et 1550-1552
- 193 SIAKOTOS A.N. FILBERT M. HESTER R.
A new method for the determination of AChE.
Biochem.Med. 1969 3:122-126
- 194 SHIMIZU N. IMAMOTO K.
Electron microscopic histochemistry of AChE.
Advances Neurol.Sci. 1970 13:725-734

- 195 SHIMIZU N. ISHII S.
Electron microscopic histochemistry of acetylcholinesterase of rat brain by Karnovsky's method.
Histochemie 1966 6:24-33
- 196 SHUTE C.C.D. LEWIS P.R.
The ascending cholinergic reticular system: neocortical, olfactory and subcortical projections.
Brain 1967 90:497-520
- 197 STEDMAN E. STEDMAN E. EASSON L.H.
Cholinesterase. An enzyme present in the blood serum of the horse.
Biochem.J. 1932 26:2056-2066
- 198 STEDMAN E. STEDMAN E. WHITE A.C.
A comparison of the cholinesterase activities of the blood sera from various species.
Biochem.J. 1933 27:1055-1060
- 199 STEIN H.H. LEWIS G.J.
Studies of acetylcholinesterase utilizing automated methodology.
Anal. Biochem. 1966 15:481-486
- 200 SUMYK G.B. YOCUM C.F.
Failure of type A botulinum toxin to inhibit acetylcholinesterase.
J.Bact. 1968 95:1970-1971
- 201 SVENSMARK O.
Localization of cholinesterases in the protein fractions of cerebrospinal fluid.
Abstr.IV Int.Congr.Biochem.Wien 1958 p.171
- 202 SVENSMARK O.
Cholinesterases in human spinal fluid and brain.
Physiol. Scand. 1961 52: 372-378
- 203 TAMMELIN G.
An electrometric method for determination of cholinesterase

- activity.
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 1953 5:267-270
- 204 TAPP J.T. MARKOWITZ H.
Infant handling : Effects on avoidance learning, brain weight and cholinesterase activity.
Science N.Y. 1963 140:486-487
- 205 TAXI J.
Histochemie des cholinestérases.
Symp. Bâle. Bibl.Anat. 1960 2:70-89
- 206 TOSCHI G.
A biological study of brain microsomes:
Exp.Cell.Res. 1959 16:232-255
- 207 TOURTELLOTTE W.W.
Multiple sclerosis and cerebrospinal fluid.
The med.Clin.North America 1963 47:1619-1627
- 208 TOURTELLOTTE W.W. PARKER J.A.
Multiple sclerosis : Correlation between immunoglobulin-G in cerebrospinal fluid and brain.
Science 1966 154:1044
- 209 TOURTELLOTTE W.W. PARKER J.A.
Some spaces and barriers in post-mortem multiple sclerosis. In : Lajthaa and Ford ed. : Progress in brain research vol 29 : Brain barrier systems NY Else.Publ. 1968
- 210 TOWER D.B. ELLIOTT K.A.C.
Activity of acetylcholine system in cerebral cortex in various unanesthetized mammals.
Am.J.Physiol. 1952 168:747-759
- 211 TOWER D.B. Mc EACHERN D.
Acetylcholine and neuronal activity cholinesterase patterns and acetylcholine in the cerebrospinal fluid of patients with cranio-cerebral trauma.
Canad.J.Res. 1949 E27:105
- 212 TOWER D.B. Mc EACHERN D.

The content and characterization cholinesterase in human cerebrospinal fluid.

213 TROTTER J.L.

AChE activity of synaptic vesicle fractions and membrane fractions prepared from rat brain tissue.

J.Neurochem. 1969 16: 805-811

214 TSUJI S.

Sur la localisation des cholinestérases à l'aide d'iodures d'esters de thiocholine.

C.R.Hebd.Seances Acad.Sci. (Paris) 1968 267:801

215 ULLMAN A.

Communication privée selon référence 131 1968

216 VACCAREZZA J.R. RUIZ D.C. DOMINGUEZ A.C.

Colorimetric method for measuring pseudocholinesterase, AChE and whole blood ChE. Its use in the presumptive diagnosis of cancer.

Experientia 1969 25:808-809

217 VIGH-TEICHMANN I. VIGH B. AROS B.

Enzyme histochemical studies on the nervous system. IV. AChE activity in the liquor contacting neuronal system of various vertebrates.

Histochemie 1970 21:322-337

218 WASER P.G.

Chemistry and pharmacology of muscarine, muscarone, and some related compounds.

Pharmacol.Rev. 1971 13:465-515

219 WEBSTER G.R. Mc KENZIE I.C.K.

Pseudo-cholinesterase levels in plasma and CSF in multiple sclerosis.

Guy's Hospital Rep. 1957 106:239-250

220 WEINTRAUB M.I. VAN WOERT M.H.

Reversal by levodopa of cholinergic hypersensitivity in Parkinson's disease.

New. Engl.J.Med. 1971 284: 412-415

- 221 WELLBAND C.G.
Combined AChE and axon staining of neuromuscular junction
in myasthenic muscle.
The anatomical record 1969 163 (2) 283
- 222 WHITTAKER V.P.
Handbook of neurochemistry 1969 350
- 223 WILLIAMS R.M.
Antibodies to acetylcholinesterase.
Proc.Nat.Acad.Sci. USA 1969 62:1175-1180
- 224 WILSON I.B.
In "The Enzymes " Boyer, Lardy, Myrback. Eds. vol 4
p. 501-519 Academic Press, N.Y. 1960
- 225 WINLUND C.C. CHAMBERLIN M.J.
Acetylcholinesterase.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 1970 40:43
- 226 WINTERINGHAM F.P.W. DISNEY R.W.
Radiometric assay of acetylcholinesterase.
Nature Lond. 1962 195:1303
- 227 WINTERINGHAM F.P.W. DISNEY R.W.
A radiometric study of cholinesterase and its inhibition.
Biochem. J. 1964 91:506-514
- 228 WOFSY L. MICHAELI D.
Affinity labeling of the anionic site of AChE.
Proc.Nation.Acad.Sci. USA 1967 58: 2296-2298
- 229 WOODWARD D.L. REED D.J. WOODEBURY D.M.
Extracellular space of rat cerebral cortex.
Amer.J.Physiol. 1967 212:367-370
- 230 YAHR M.D.
Levodopa and parkinsonism
Clin.Pharmacol.Therap. 1971 12:332-334

- 231 YOUNGSTROM K.A.
Acetylcholinesterase concentration during the development
of the human fetus.
J.Neurophysiol. 1941 4:473-477
- 232 ZUPANCIC A.O.
Acetylcholinesterase and cholinorecepteur.
Biochim.Biophys.Acta 1964 99:325
- 233 ZUPANCIC A.O.
Evidence for the identity of anionic centers of cholinesterase with cholinorecepteurs.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 1967 144:689-693
- 234 ZUPANCIC A.O.
On the chemical distinctions between cholinesterase and cholinoreceptor.
Life Sci. 1969 8:989-992
- 235 ZUPANCIC A.O.
Kinetic response of a membrane-bound acetylcholinesterase to cholinergic activating and blocking agents.
FEBS Letters 1970 11:277-280

--*--
*

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'ACETYLCHOLINESTERASE
EN NEUROLOGIE.MISE AU POINT ET UTILISATION D'UNE
METHODE RADIOISOTOPIQUE

<u>INTRODUCTION</u>	p. 1
<u>I . L'ENZYME</u>	p. 6
I . 1 . L'AChE native	p. 7
I . 2 . Les isoenzymes de l'AChE	p. 12
I . 3 . L'AChE in situ	p. 14
I . 3 . 1 . L'AChE dans le S.N.C.	p. 14
I . 3 . 2 . L'AChE dans la cellule	p. 15
I . 3 . 3 . L'AChE dans le L.C.R.	p. 20
<u>II . LES METHODES</u>	p. 25
II . 1 . Les méthodes antérieures	p. 26
II . 1 . 1 . Les méthodes manométriques	p. 26
II . 1 . 2 . Les méthodes spectrophotométriques	p. 28
II . 1 . 3 . Les méthodes radioisotopiques	p. 30
II . 2 . Notre méthode	p. 34
II . 2 . 1 . Le principe	p. 34
II . 2 . 2 . Le matériel	p. 34
II . 2 . 3 . Le protocole	p. 37
II . 2 . 4 . Justification de la méthode	p. 38
II . 3 . Discussion	p. 44
<u>III . L'AChE ET LA PATHOLOGIE</u>	p. 46
III . 1 . Définition d'un taux normal	p. 47
III . 1 . 1 . Le choix des témoins	p. 48
III . 1 . 2 . Les apports de la littérature	p. 48
III . 2 . L'AChE en neurologie	p. 49
III . 2 . 1 . Les données de la littérature	p. 50
III . 2 . 2 . Nos observations	p. 53
III . 3 . L'AChE et quelques syndromes	p. 58
III . 3 . 1 . L'AChE dans la S.E.P.	p. 58
III . 3 . 2 . L'AChE dans les méningites	p. 59
III . 3 . 3 . L'AChE dans les processus néoplasiques	60

III . 3 . 4 . L'ACHé dans les épilepsies	p. 62
III . 3 . 5 . L'ACHé dans quelques observations	p. 63
III . 4 . L'ACHé dans la maladie de Parkinson	p. 65
III . 4 . 1 . Les observations	p. 65
III . 4 . 2 . Discussion	p. 68
III . 4 . 3 . Expérimentation chez l'animal	p. 68
III . 4 . 4 . Nos résultats	p. 71
 CONCLUSIONS -----	 p. 76
 BIBLIOGRAPHIE -----	 p. 79

--*--
*--

